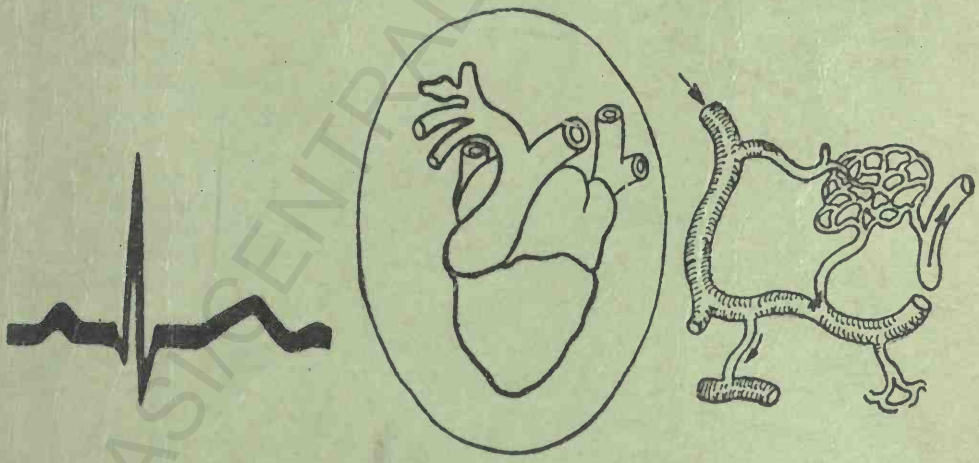
UNIVERSITATEA „AL. I. CUZA“ IAŞI
FACULTATEA DE BIOLOGIE-GEOGRAFIE

Lector Dr. VASILE P. HEFCO

LUCRĂRI PRACTICE DE FIZIOLOGIE A ANIMALELOR ŞI A OMULUI:

SÎNGELE, INIMA, CIRCULAȚIA SANGUINĂ



IAŞI—1975

BCU IAȘI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BIBL. CENTR. UNIV.
„M. EMINESCU" IAȘI
III-156356

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

39/33

4695

U N I V E R S I T A T E A "A L. I. C U Z A" I A S I

FACULTATEA DE BIOLOGIE-GEOGRAFIE

Lector Dr.VASILE P. HEFCO

LUCRARI PRACTICE DE FIZIOLOGIE A ANIMALELOR SI A OMULUI:

SINGELE, INIMA , CIRCULATIA SANGUINA.

9.1637

142372
B.C.U. - IASI

I A S I

- 1 9 7 5 -

29 SEP. 1975

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

23 APR 1978
B.C.U. „M. EMINESCU"
— IAŞI —
ado 469590

I. 29.056
BIBLIOTECA DE BIOLOGIE
T. III - 6133

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

P R E F A Ţ A

Acest manual de lucrări este scris pentru studenţii Facultăţii de Biologie-Geografie, în vederea demonstrării unor capitole din cursul de fiziologie a animalelor şi a omului.

La întocmirea acestei fascicule, cît şi a celor care vor urma, s-a avut în vedere:

-De a demonstra procesele fiziologiei clasice şi moderne atît la animale cît şi la om.

-De a prezenta studenţilor unele aparate şi metode moderne, folosite în studiul fiziologiei.

-De a prezenta unele lucrări, cu aplicabilitate în practica medicală şi veterinară.

-De a stimula participarea activă a studenţilor în înţelegerea fenomenelor studiate. Aceasta a fost motivul pentru care în loc de explicarea unor fapte uşor de dedus, se pune întrebarea (De ce?).

Unele lucrări tratate în prezenta fasciculă, vor putea fi reproduse de către profesorii de la catedrele de biologie, fără un echipament deosebit.

Fiecare capitol începe cu cîteva consideraţii teoretice foarte generale. De asemeni fiecare lucrare prezintă unele date teoretice de bază după care se expune principiul metodei, materialul necesar, desfăşurarea lucrării, recomandări şi unele întrebări de control. Prin întrebările de control s-a urmărit verificarea cunoştinţelor teoretice şi dezvoltarea spiritului de inventivitate.

Lucrările expuse în manual, nu urmăresc înlocuirea completă a rolului instructorului.

Lucrările tratate reprezintă rezultatul experienţei autorului, obţinute în cadrul colectivelor conduse de Acad. P. Jitariu-Univ. "Al. I. Cuza" Iaşi; Acad. E. Pora-Univ. Cluj-Napoca; Acad. Gr. Benetato-Institutul de fiziologie normală şi patologică Bucureşti; Acad. K. Lissak-Univ. Pécs, cît şi în urma consultării bibliografiei de specialitate, din care o parte este expusă la sfîrşitul lucrării.

Autorul îşi exprimă recunoştinţa tuturor celor care i-au prezentat sau îi vor prezenta sugestii referitoare la conţinutul manualului.

Vasile P. Hefco

Iaşi
aprilie, 1975.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CUPRINS.

CAPITOLUL I.

FIZIOLOGIA SINGELUI

Pag.

1.VOLUMUL SANGUIN

A.Determinarea volemiei cu ajutorul eritrocitelor marcate cu Cr^{51}.....1

B.Determinarea volemiei prin metoda colorantilor.....3

2.HEMATOCRITUL.....5

Microhematocritul.....6

COMPOZITIA SINGELUI.

3.PROTEINELE SANGUINE

A.Identificarea proteinelor din plasmă şi ser sanguin.....7

B.Electroforeza proteinelor.....8

C.Dozarea cantitativă a proteinelor serice refractometri....12

4.DOZAREA IONILOR DE Na,K,Ca DIN SINGE.....15

5.NUMARAREA ELEMENTELOR FIGURATE ALE SINGELUI

A.Numărarea eritrocitelor.....19

B.Numărarea leucocitelor.....23

C.Numărarea eozinofilelor.....24

D.Numărarea trombocitelor.....25

6.DETERMINAREA CANTITATIVA A HEMOGLOBINEI.....26

A.Dozarea hemoglobinei cu ajutorul colorimetrului Sahli.....26

B.Dozarea fotometrică a hemoglobinei.....28

Indici derivaţi.....29

7.PROPRIETATILE PIGMENTILOR RESPIRATORI

A.Capacitatea de oxigen a lichidelor biologice.....29

B.Spectrul de absorbţie al hemoglobinei şi a unora din derivaţii săi.....31

C.Trasarea spectrului de absorbţie a unor pigmenţi respiratori.....33

8.PROPRIETATILE TAMPON ALE SERULUI SANGUIN.....34

9.REZISTENTA GLOBULARA.....35

10.VITEZA DE SEDIMENTARE A HEMATIILOR.....37

11.COAGULAREA SINGELUI.....39

1.Timpul de coagulare.....40

2.Timpul de recalcifiere(Howell).....40

3.Toleranţa la heparină „in vitro".....41

Studiul coagulării legate de vas.

1.Timp de sîngerare.....42

2.Rezistenţa capilară.....42

BUCHAREST UNIVERSITY LIBRARY

Timpul de protrombină Quick.....43
12.DETERMINAREA GRUPELOR SANGUINE.....44
A.Determinarea aglutinogenelor.....44
B.Determinarea aglutininelor.....45
13.DETERMINAREA FACTORULUI Rho(D).....46

CAPITOLUL II

FIZIOLOGIA INIMII.

14.INREGISTRAREA CONTRACTIILOR INIMII DE BROASCA.....48
15.AUTOMATISMUL INIMII DE BROASCA.LIGATURILE LUI H.STANNIUS....51
16.BLOCUL CARDIAC SI STIMULAREA ELECTRICA A INIMII.....53
17.PARTICULARITATILE FUNCTIONALE ALE MUSCHIULUI CARDIAC.
A.Legea „tot sau nimic".....54
B.Particularităţile excitabilităţii cardiace şi extrasistola55
18.MANIFESTARI ALE ACTIVITATII INIMII.ELECTROCARDIOGRAFIA.....57
19.FONOCARDIOGRAFIA.....60
20.AUSCULTATIA ZGOMOTELOR CARDIACE.....62
REGLAREA ACTIVITATII INIMII.
21.PERFUZIA INIMII DE BROASCA SI INFLUENTA UNOR ELECTROLITI
SI HORMONI ASUPRA ACTIVITATII INIMII.....62
22.NERVII VAGI.....65
23.ACTIUNEA NERVULUI VAG ASUPRA INIMII DE PISICA.....67
24.INIMA DE BROASCA TESTOASA.....69
FACTORII MECANICI CARE INTERVIN IN REGLAREA INIMII.
25.LEGEA INIMII.....72

CAPITOLUL III

FIZIOLOGIA SISTEMULUI VASCULAR.

26.PRESIUNEA ARTERIALA LA OM.
A.Metoda auscultatorie.....75
B.Metoda palpatorie(Riva-Rocci).....77
27.PRESIUNEA ARTERIALA LA ANIMALE SI REGLAREA EI.....78
28.PULSUL ARTERIAL.....83
29.CIRCULATIA CAPILARA.
A.Circulaţia capilară la broască.....85
B.Capilaroscopie la om.....88
C.Circulaţia capilară în aripa insectelor.....89
30.ECHILIBRUL HIDRIC SI EDEMUL.....90
ANEXE.....93
BIBLIOGRAFIE.....100

BCU "CAROL I" BIBLIOTECA CENTRALĂ UNIVERSITARĂ

CAPITOLUL I

FIZIOLOGIA SINGELUI

Alături de limfă, sîngele alcătuieşte mediul intern al organismului. El are o importantă funcţie homeostatică, participînd la realizarea condiţiilor de viaţă ale organelor şi ţesuturilor organismului. Realizează aceasta prin transportul gazelor (O_2, CO_2, azot), al substanţelor nutritive, al factorilor de apărare(anticorpi, leucocite) şi al căldurii, cu rol în procesul de termoreglare. Prin sînge sînt transportate substanţe (hormoni, vitamine, cataboliţi), care constituie regulatori umorali ai organismului şi tot prin el sînt transportaţi produşi de degradare metabolică, care urmează a fi excretaţi.

Prin intermediul sistemelor tampon, sîngele contribuie la menţinerea reacţiei acido-bazice, iar prin factorii de coagulare împiedică pierderea sa în urma lezării vaselor.

1. VOLUMUL SANGUIN.

Metodele actuale de măsurare ale volumului sanguin circulant a unui animal, se bazează pe principiul diluţiei indirecte. Cînd o cantitate de substanţă este introdusă şi amestecată uniform într-un volum de solvent, concentraţia obţinută la echilibru este invers proporţională volumului de solvent. Deci cu cît volumul solventului va fi mai mare, concentraţia finală va fi mai mică.

A. Determinarea volemiei cu ajutorul eritrocitelor marcate cu Cr^{51}.

În această lucrare se vor incuba eritrocitele unor specii de vertebrate cu crom radioactiv(Cr^{51}), care se fixează stabil de porţiunea globinică a hemoglobinei. După dispersarea în circulaţia generală a unei cantităţi precis măsurate de eritrocite marcate, diluţia lor în probele de sînge este măsurată cu un contor de radiaţii. Pe baza măsurătorilor făcute, se calculează volemia.

Echipament necesar: Incubator, contor cu scintilaţie, seringă de tuberculină, seringi obişnuite, eprubete cu fund plat, $Na_2Cr^{51}O_4$.

Prepararea cromului marcat. Cr^{51} are perioada de înjumătăţire de 27,8 zile şi emite radiaţii gama. Pentru un iepure este suficientă o doză de 6 microcurie de $Na_2Cr^{51}O_4$ care să poată fi detectată cu instrumentele folosite. Soluţia sterilă de crom marcat este diluată cu soluţia Ringer pentru mamifere, obţinîndu-se o concentraţie de aproximativ 12 microcurie pe ml.

Incubarea eritrocitelor. Se cîntăreşte iepurele. Cu o serin-

gă heparinizată extragem aproximativ 3 ml sînge din vena urechii, pe care îl transferăm într-o eprubetă de centrifugă.Se adaugă o,5ml soluţie de Cr^{51} diluată şi se incubează timp de 20 minute la 37°C,agitînd din timp în timp eprubeta.In acest interval de timp majoritatea Cr^{51} va pătrunde în eritrocite.Se centrifughează sîngele şi se decantează plasma.Celulele sedimentate se resuspendă în soluţia Ringer.Se recentrifughează şi se decantează plasma. Repetăm spălarea eritrocitelor.Final se suspendă eritrocitele în soluţia Ringer pînă la volumul lor original.Care este scopul spălării celulelor?

Injectarea.Cu o seringă de tuberculină injectăm în vena urechi 1 ml de suspensie de eritrocite.Este foarte important ca toate globulele marcate să pătrundă în circulaţie.Orice pierdere în această etapă experimentală,va accentua mult eroarea rezultatului final.Se cîntăreşte seringa înainte şi după injecţie în vederea determinării exacte a cantităţii de sînge marcat injectat.Se lasă iepurele în repaos timp de 30 minute pentru răspîndirea uniformă a eritrocitelor marcate în sîngele circulant al receptorului.Intre timp se prepară soluţia standard.

Prepararea soluţiei standard.Se diluează într-un balon cotat 0,5ml de suspensie celulară rămasă cu 50 ml apă distilată(diluţia 1:100).Inainte de a aspira suspensia celulară,sîngele se agită cu atenţie în vederea suspendării celulelor.După diluţie se aspiră 3 ml de sînge standard diluat şi hemolizat pe care îl introducem într-o eprubetă cu fund plat.Se acoperă şi se măsoară radioactivitatea cu un contor cu scintilaţie.

Colectarea sîngelui.După 30 minute dela injectare,se extrag din urechea opusă 4 ml sînge venos.Se pipetează exact 3 ml sînge integral într-o eprubetă cu fund plat.Se determină de asemeni hematocritul sîngelui colectat.

Măsurarea radioactivităţii.Radioactivitatea tuturor probelor se numără cu un contor cu scintilaţie.Radioactivitatea probelor este calculată în numărul de impulsuri pe minut.Se scade activitatea de fond la standard şi probe.

Calcul.Volumul globulelor roşii ($V_{g.r.}$) este dat de ecuaţia:

$$V_{g.r.} = \frac{Q}{C}$$

în care Q este cantitatea injectată(impulsuri pe minut) de eritrocite marcate cu Cr^{51} iar C este concentraţia finală a eritrocitelorCr^{51} din circulaţie(impulsuri pe minut/ml a celulelor testate).

$$Q = \frac{V_1 \times C_s \times 100}{\text{Volumul probei numărate}}$$

în care V_1 este volumul injectat în ml iar C_s reprezintă radioactivitatea probei/minut a standardului.100 este factorul de diluţie pentru standard.

$$C = \frac{\text{Impulsuri pe minut a probei} \times 100}{\text{Volumul probei numărate} \times \text{hematocrit}}$$

Final se calculează volemia pe baza volumului globulelor roşii şi a hematocritului măsurat.

Se vor compara rezultatele obţinute de toţi studenţii şi se vor face comentarii referitoare la sursele de eroare şi exactitatea metodei.

Volemia la vertebrate poikiloterme.

Cu ajutorul aceleeaşi metode,folosind unele mici modificări, putem determina volemia şi la peşti,batracieni,reptile.

1.Marcarea celulelor cu Cr^{51} este mai lentă şi mai puţin completă comparativ cu homeotermele.Se vor folosi 10 microcurie Cr^{51}/ ml sînge incubat.Sîngele de incubat se colectează dela un donator iar celulele marcate se injectează într-un animal nefolosit.Incubarea durează 1 oră iar la temperatura de 10-15°C-un timp mai îndelungat,cu agitare la intervale de 5-10 minute.Celulele incubate se vor spăla cel puţin de 3 ori cu soluţie Ringer adecvată,centrifugînd şi decantînd supernatantul după fiecare spălare.

2.Injectarea eritrocitelor marcate se face într-o venă evidentă pe animal anesteziat.Se va utiliza un ac hipodermic foarte subţire (Nr.28-30).Uneori se poate injecta direct în inimă.

3.După 20-30 minute dela injectare,se prelevează o cantitate de sînge,se pipetează un volum măsurat într-un tub adecvat şi se măsoară radioactivitatea.Sîngele se va scoate din alt loc decît cel folosit la injectare(De ce?)Se prepară un standard ca şi în cazul iepurelui,diluat cu un volum corespunzător.Volumul globulelor roşii şi volumul sanguin total se va calcula cu ajutorul aceleaşi formule,corectată pentru volumul utilizat.

B.Determinarea volemiei prin metoda coloranţilor.

Colorantul folosit pentru injectare trebuie în primul rînd să nu fie nociv,să nu fie uşor excretat; trebuie să coloreze numai plasma şi să nu fie absorbit de globule sau de elementele celulare ale vaselor sanguine.Colorantul cel mai des folosit este

albastru de Evens(T 1824),care este eliminat destul de lent din circulaţie(4,8% pe oră).

Principiu metodei. O cantitate D de colorant este injectată în circulaţie,unde este diluată de volumul V al plasmei sanguine, ce urmează a fi determinat.Se prelevează o cantitate de sînge şi se determină concentraţia colorantului d pe ml cu ajutorul unui colorimetru.Cunoscînd D şi d pe ml se calculează volumul plasmei(V) V=D/d în mililitri.

Tehnica:Se pregătesc 2 siringi de 5 ml parafinate şi 2 eprubete de centrifugă.Punem în fiecare eprubetă cîte 0,2ml oxalat de K 2% (anticoagulant) şi uscăm la 60°C.Se prepară aproximativ 20 ml soluţie de colorant(2,4mg/ml în NaCl 0,85%).Din această soluţie se injectează 5 ml.

Se prelevează într-o siringă parafinată o cantitate de 5ml de sînge din vena jugulară dela o pisică anesteziată.Se introduce sîngele într-o eprubetă de centrifugă cu oxalat.Se acoperă deschiderea eprubetei cu degetul mare şi înclinăm conţinutul de 2-3 ori în vederea solvirii oxalatului,după care se centrifughează.Se decantează supernatantul.

Cu cealaltă siringă se injectează lent 5 ml de colorant în vena jugulară în direcţia inimii.Se aşteaptă 4 minute pentru răspîndirea uniformă a colorantului în plasmă,după care se scot 5ml sînge într-o eprubetă cu oxalat.Se centrifughează şi se decantează plasma.Intensitatea culorii plasmei se colorimetrează la un fotoelectrocolorimetru contra plasmei fără colorant.Densitatea optică a plasmei colorate scade rapid,de aceea citirea la colorimetru trebuie făcută imediat după centrifugare.Pe baza extincţiei citite se calculează volumul plasmatic.

Curba de etalonare se construieşte folosind o scară de diluţii a colorantului în plasma proaspăt recoltată sau în apă.Diluţia iniţială a colorantului este cam de 20-25 ori.

In vederea determinării volemiei,se află concomitent şi hematocritul. $\text{Volemia} = \frac{\text{Volumul plasmatic x 100}}{\text{100- hematocrit somatic}}$ De unde iese această formulă?

Recomandări.De calculat volemia şi de exprimat volumul sanguin în procente faţă de greutatea corporală.

2.HEMATOCRITUL.

Termenul hematocrit se referă în realitate la tubul folosit în vederea determinării raportului plasmei sanguine la suma elementelor figurate sau numai a eritrocitelor.Totuşi în practică acest termen semnifică procentul volumului eritrocitar din sîngele integral.Determinarea lui se face prin 2 procedee :A.macrometoda(Wintrobe) şi B.micrometoda(microhematocritul).

Macrometoda Wintrobe.

Echipament necesar:Hematocrit;centrifugă;anticoagulant;material necesar pentru recoltarea sîngelui.

Hematocritul este format dintr-un tub de sticlă cu diametru de o,5 mm, gradat în 100 diviziuni,dela 0 la 100 (Fig.1).Se pot confecţiona tuburi de hematocrit din pipetele folosite la determinarea vitezei de sedimentare a hematiilor.Tuburile de hematocrit se adaptează perfect la 2 braţe de centrifugă.

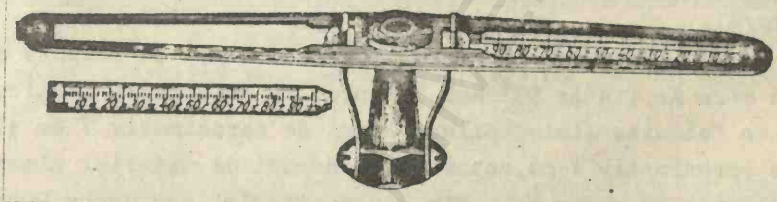


Fig.1 .Tuburile hematocrit şi suportul de centrifugă.

Sîngele se colectează pe anticoagulant(1 picătură de soluţie de heparină la 5 ml sînge sau amestecul anticoagulant Wintrobe, sau se suflă în prealabil în tub praf de oxalat de K). Se aspiră sîngele de pe pulpa degetului,se potriveşte coloana de lichid la capătul superior exact la diviziunea 100.Punem apoi tubul în suport avînd grijă să fie bine închis la partea inferioară cu un dop de cauciuc şi centrifugăm la 3000 ture pe minut timp de 10 minute.După acest timp de centrifugare volumul eritrocitar din tub nu mai scade.La sfîrşitul acestui interval se observă că sîngele s-a separat într-o coloană limpede şi incoloră de plasmă şi o coloană roşie formată din globule.Lungimea celor două coloane este citită pe gradaţia tubului.

Proporţia normală dintre plasmă şi globule în sîngele de om, este de aproximativ 54 (61-49) la 46% (39-51),adică volumul globulelor(hematocritul) reprezintă 46% din volumul total al sîngelui.

La această cifră se fac următoarele corecţii:

-Plasma interstiţială.Chiar după o centrifugare completă,între eritrocite rămîne un spaţiu cu plasmă interstiţială reţinută

considerată a reprezenta aproximativ 4% din volumul eritrocitar global.Pentru scăderea acestui volum,se înmulţeşte valoarea hematocritului cu factorul 0,96.

-Stratul leucocitar-trombocitar.In mod normal grosimea acestui strat este neglijabilă(sub 1%).In caz de leucocitoză puternică, acest strat creşte considerabil şi trebuie măsurat pentru a aprecia corect atît stratul eritrocitar cît şi cel plasmatic.

-Hematocritul arterial este mai scăzut.Obişnuit se determină hematocritul sîngelui venos.Pentru a afla hematocritul somatic, care se foloseşte la determinarea volumului sanguin,se înmulţeşte hematocritul venos măsurat,cu 0,864.Diferenţa dintre hematocritul venos şi cel arterial este dată de mărimea hematiilor,care în sîngele venos îşi măresc volumul.

Microhematocritul.

Ca anticoagulant se preferă heparina.Cea existentă în comerţ se diluează cu apă distilată pînă se obţine o concentraţie de 0,1mg/ml.

Tuburile pentru microhematocrit se umplu cu această soluţie după care se ţin la 37° sau 56° pînă la evaporarea lichidului.Tuburile folosite sînt capilare lungi de aproximativ 7 cm şi cu un Ø de aproximativ 1 mm,astupate cu dopuri de material plastic. Recoltarea se poate face din sînge arterial sau venos.Puncţia degetului trebuie să fie suficient de profundă pentru ca sîngele să curgă uşor.Pielea trebuie să fie perfect uscată.După ştergerea primelor 2-3 picături,se umple tubul prin acţiunea capilară. Capătul tubului se închide la flacără sau se astupă cu dop de plastic.

Există centrifugi speciale pentru hematocrit,care permit scurtarea timpului de centrifugare la 10,8 sau 4 minute,prin mărirea turaţiilor.

Citirea se face pe o nomogramă specială.Rezultatele obţinute se pare că sînt cu 1,2-1,7 u. mai mici ca cele de la macrometodă.

Recomandări:1.Se va desena nomograma pentru determinarea hematocritului.2.De notat rezultatul obţinut din sîngele propriu.

Intrebări de control:Poate înfluenţa(şi cum anume) valoarea hematocritului,obţinerea sîngelui prin stoarcerea puternică a degetului?.

COMPOZITIA SINGELUI.

3. PROTEINELE SANGUINE.

Proteinele plasmatice îndeplinesc numeroase roluri în organism. Fibrinogenul este esenţial pentru coagularea sîngelui. Toate cele trei fracţiuni proteice-albumine, globuline şi fibrinogenul-servesc la menţinerea presiunii osmotice a sîngelui. Ele conferă un grad de vîscozitate sîngelui, care este un factor al menţinerii presiunii sanguine normale. Formează 1/6 din sistemele tampon ale plasmei. Au rol în transportul substanţelor. Astfel anticorpii ce reacţionează cu antigenii multor microorganisme, sînt asociate cu γ-globuline. Hormonii, enzimele, factorii coagulării sînt părţi ale α- şi γ-globulinelor. Ele asigură stabilitatea sîngelui. Servesc ca rezerve de proteine.

Concentraţia proteinelor totale din plasmă şi proporţia celor trei fracţiuni proteice, variază dela specie la specie dar în condiţii fiziologice ele rămîn relativ constante la indivizii aceleaşi specii. Descriem mai jos cîteva procedee de evidenţiere calitativă şi cantitativă a lor.

A. Identificarea proteinelor din plasmă şi ser sanguin.

Material necesar: plasmă şi ser sanguin; NaCl; $SO_4(NH_4)_2$; SO_4Mg; stativ cu eprubete; băi de apă şi termometre.

Principiu: Proteinele sanguine pot fi evidenţiate calitativ prin precipitare cu anumite săruri, sau prin determinarea temperaturii minime la care începe coagularea.

a. separarea prin precipitare cu săruri.

-Intr-o eprubetă se pun 10 ml de plasmă în care adaugăm cristali de NaCl pîna la saturaţie. Fibrinogenul precipită. Se filtrează şi cu filtratul obţinut se lucrează mai departe.

-Peste filtrat se adaugă $SO_4(NH_4)_2$ pîna la saturaţie. Se obţine un precipitat de serumalbumine, care se filtrează.

-Filtratului de mai sus se adaugă SO_4Mg pînă la saturaţie. Se obţine un precipitat de serumglobuline.

b. separarea proteinelor prin căldură.

-10 ml plasmă se pun la baie la temperatura de 56°C. Coagulează fibrinogenul. Se separă prin filtrare iar filtratul se pune la baie la 68°C. La temperatura de 68° încep să coaguleze serumglobulinele. Se filtrează iar filtratul se pune la baie la 78°. La această temperatură începe coagularea serumalbuminelor.

B.Electroforeza proteinelor.

Consideraţii generale.Prin electroforeză se înţelege în general migrarea particulelor coloidale sub influenţa unui curent electric.Fenomenul se aseamănă cu ionoforeza,adică cu migrarea ionilor într-un cîmp electric.In cazul ionoforezei viteza (v) de migrare a particulelor ionice este direct proporţională cu sarcina lor(e),cu intensitatea cîmpului electric (H) şi invers proporţională cu vîscozitatea mediului în care are loc deplasarea (η) precum şi cu factorul $6\pi r$ calculat pentru formele sferice:

$$v=eH/6\pi r\eta$$

Mobilitatea electroforetică(u) este definită ca fiind drumul parcurs de o particulă în cm/sec. la o variaţie a potenţialului de 1 volt/cm.Ea se exprimă prin raportul dat de viteza particulei şi cîmpul electric în care se mişcă: $u=v/H$.

In cazul electroforezei intervin o serie de factori interferenţiali,care modifică raporturile stabilite pentru ionoforeză:

a.Sarcina ionului(e) corespunde totdeauna sarcinii unui electron sau unui multiplu al său($4,8x10^{-10}$ unităţi).La proteine sarcina lor este funcţie de pH mediului.In mediu alcalin sarcina proteinelor este negativă,iar în mediu acid, sarcina este pozitivă. De ce?cu cît mediul de electroforeză va avea un pH mai îndepărtat de punctul izoelectric,cu atît sarcina(e) va fi mai mare şi ca o consecinţă viteza de migrare va creşte.

b.Viteza de migrare a particulelor coloidale este influenţată şi de temperatură,prin modificările pe care le aduce vîscozităţii mediului(η).

c.Mobilitatea particulelor încărcate electric este frînată de aglomerarea pe suprafaţa lor a ionilor cu sarcini contrare. Aceşti ioni tind să antreneze particula coloidală în direcţia opusă sensului de migrareDiminuarea vitezei de migrare este determinată de concentraţia şi sarcina ionilor electrolitului şi de mărimea şi forma particulelor proteice.Acţiunea ionilor într-o soluţie este dată de suma acţiunii lor parţiale:$I=\Sigma CZ^2$,iar jumătatea acestei sume a fost numită forţa ionică notată cu μ:

$$\mu=\frac{1}{2}\ Ci{Z_i}^2$$

în careΣ = suma;Ci=concentraţia molară a unui anumit ion;iar Zi= valenţa ionului.

- Prin electroforeză se va reuşi separarea particulelor coloidale cu sarcini electrice diferite şi deci cu viteză de migrare diferită,cu obligaţia să se realizeze condiţii de mediu cu pH

şi forţă ionică cunoscută,menţinîndu-se o vîscozitate constantă în tot timpul efectuarii electroforezei,prin asigurarea unei temperaturi constante.

Electroforeza se poate executa folosind aparate în care migrarea se face în interiorul unei faze lichide sau pe un mediu poros(hîrtie,gel de agar sau amidon,gel de acrylamidă etc),ultima fiind denumită electroforeză de zonă.

Electroforeză pe hîrtie cu voltaj scăzut.

Principiul metodei:Se aplică serul de analizat sub formă de picătură sau dungă pe o hîrtie de filtru îmbibată cu soluţia tampon şi aşezată într-un cîmp electric.Sub acţiunea curentului electric redresat aplicat la capetele benzii de hîrtie,componentele proteice migrează în direcţia şi cu viteza corespunzătoare sarcinii lor, separîndu-se,iar vizualizarea lor se face cu ajutorul coloranţilor.Spoturile colorate pot fi evaluate prin fotometrare directă sau prin eluare.

Echipament necesar: Aparatul de electroforeză. Este compus dintr-o cameră umedă sau cuvă de electroforeză şi un redresor. Un tip de cameră umedă este indicat în Fig. 2.

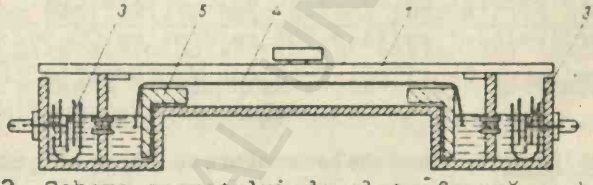


Fig.2 .Schema aparatului de elctroforeză pe hîrtie.

Ea este construită din material plastic şi acoperită etanş cu un capac(1).La cele două extremităţiale cuvei se află camera electrozilor divizată în cîte două compartimente printr-un perete.Compartimentul extern(3) adăposteşte electrozii de platină (0,5-0,8mm în diametru),iar în compartimentul intern pătrund capetele hîrtiei de electroforeză(4).Cele două compartimente comunică între ele printr-un labirint.Labirintul reuşeşte să împiedice variaţiile pH şi compoziţia în electroliţi din compartimentul intern şi de pe banda de hîrtie de filtru,datorită produşilor de electroliză.

Benzile de electroforeză sînt întinse pe o ramă din material sintetic(5) peste care se aplică un dispozitiv(cleme) de fixare a benzilor.In timpul lucrului toate compartimentele se umplu cu soluţie tampon.Capacul dela aparatele mai moderne prezintă deschideri închise cu o uşă glisantă,în dreptul cărora se aplică

serul de analizat.

Redresorul aparatului trebuie să furnizeze un curent continuu,de tensiune reglabilă şi să fie prevăzut cu instrumente sensibile pentru citirea şi ajustarea precisă a curentului.

Material necesar: Hîrtia de filtru.Se foloseşte aceeaşi hîrtie ca şi în cromatografie.Ea trebuie să posede o adsorbţie minimă a diferitelor fracţiuni şi să aibă o structură omogenă şi grosime egală pe toată suprafaţa ei.Cele mai cunoscute hîrtii,folosite în acest scop sînt: hîrtia Whatmann Nr.1,Nr.4,Nr.100;hîrtia de filtru Munktell Nr 20; hîrtia de filtru Schleicher şi Schül Nr 2024,2043a,b.

-Soluţia tampon de barbiturat,pH=8,6; μ=0,05
-1,84 g acid dietilbarbituric(veronal)
-10,30 g barbital de Na în 1000ml apă distilată.
-Colorant:-albastru de bromfenol-1 g.
-alcool etilic saturat cu clorură mercurică-100ml
-lichid de spălare:-acid acetic 0,5%
-Fixativ:-acetat de Na 2% şi acid acetic 10%.
-Solvent:-alcool metilic 50% ce conţine CO_3Na_2 5%
-Diafanizarea benzilor:-2 volume α-bromnaftaleină
-1 volum oleu de parafină

Mod de lucru:Banda de electroforeză (3 cm lăţime şi lungă în funcţie de dimensiunea aparatului) se umectează cu soluţia tampon şi se întinde pe cadru de extensie a camerei umede în aşa fel încît capetele ei să pătrundă în compartimentele interne cu soluţia tampon.După întinderea perfect orizontală a benzilor,se pune capacul cu deschiderile spre catod.Serul se aplică cu o micropipetă de 0,01 ml,pe hîrtie în dreptul deschiderii de pe capac.Serul nu se aplică pe toată lăţimea hîrtiei ci se lasă marginile libere pe ambele laturi pe o distanţă de 3mm.

Electroforeza.Aplicînd la borne o tensiune de 150 V şi 5mA se obţine în 7 ore o migrare a proteinelor pe o distanţă de 9 cm. După acest interval se opreşte aparatul,se usucă benzile la temperatura camerei şi apoi se introduc în etuvă la 100°C timp de 10 minute.

In vederea colorării,se ţin benzile în colorant timp de 10 minute,după care se înlătură excesul de colorant prin spălări succesive în baie cu acid acetic 0,5% pînă cînd ultimul lichid de spălare rămîne incolor (obişnuit 3 spălări a 5-10 minute)

Fixarea benzilor se face timp de 2 minute,introducîndu-le în fixativ.Benzile se usucă la temperatura camerei sau în termostat(80°).După uscare ne apar fracţiunile proteice indicate în Fig. 3 .

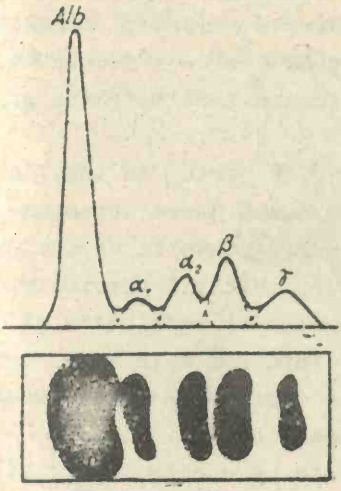


Fig.3.Proteinograma unui ser uman normal.

Evaluarea cantitativă prin eluţie.Se decupează fiecare spot corespunzător unei anumite fracţiuni,se secţionează în piese mici şi se trece într-o eprubetă cu solvent(6ml). După 30 minute de eluţie se citeşte la fotoelectrocolorimetru FEK-M, filtru roşu(550-600nm).Din valorile obţinute se scade valoarea martorului,obţinut din eluatul unei porţiuni necolorate din aceeaşi bandă.Suma extincţiilor citite este considerată ca 100%,din care se calculează procentul ce revine fiecărei fracţiuni proteice.

Curba standard se realizează cu o proteină de concentraţie cunoscută,prelucrată în acelaşi mod cu serul.

Evaluarea cantitativă prin metoda fotometrică directă.

Principiu:sedetermină absorbţia(extincţia) luminei de către o bandă diafanizată (transparentă),într-un aparat adecvat.

Diafanizarea hîrtiei colorate de electroforeză se realizează ţinînd-o în amestecul de diafanizare.Imbibiţia cea mai bună se obţine la vid,iar în lipsa vidului benzile vor sta peste noapte în lichidul de imbibiţie.Hîrtia transparentă se introduce între 2 plăci de sticlă(1mm grosime)(1 Fig.4),avînd grijă să nu se formeze bule de aer,care constituie o cauză de eroare.Plăcile se pun în dreptul unei fante(2).Intr-o parte a fantei se află sursa de lumină(3) iar în partea opusă-celula fotoelectrică(4).

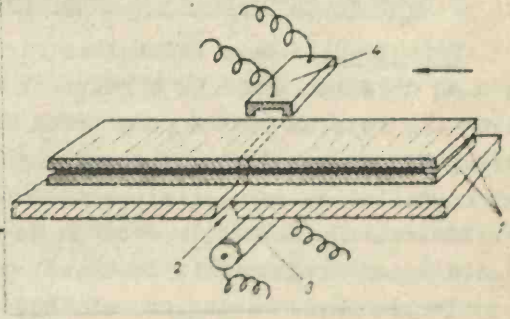


Fig. 4.
Schema principiului de funcţionare a aparatului de evaluare a electroforegramei pe hîrtie.Descrierea în text.

Din curentul electric generat de fotocelulă se determină valoarea extincţiei:

$$E = \frac{\text{lumina transmisă prin zona necolorată}}{\text{lumina transmisă prin zona colorată}}$$

La dispozitivele semi-automate deplasarea benzei şi înregistrarea extincţiei este automată.Curba obţinută este evaluată de către experimentator.La dispozitivele automate înregistrarea şi evaluarea sînt complet automatizate.

Evaluarea curbei electroforetice(Fig. 3 partea de sus).In diagrama electroforetică se obţine cîte o curbă Gauss,corespunzătoare fiecărei fracţiuni.Aria acestei curbe poate fi determinată planimetric sau gravimetric.In cazul determinării gravimetrice, ariile ce corespund curbelor Gauss separate,sînt secţionate şi cîntărite la balanţa de torsiune (aria cîntărită este aceea care corespunde întregii curbe Gauss.Astfel la cîntărirea curbei Gauss a fracţiunii albuminice, se ia şi porţiunea care coincide cu fracţiunea α_1-globulinică (semnele punctate pe electroforegramă). Suma tuturor cîntăririlor este considerată ca 100% pe baza cărora se calculează procentul fiecărei fracţiuni.

La aparatele complet automatizate,modul de evaluare este descris în prospectul aparatului.

Recomandări:Se va ataşa la referat o electroforegramă obţinută şi se va calcula procentul şi cantitatea care revine fiecărei fracţiuni.

Intrebări de control:Pe ce se bazează posibilitatea de separare a fracţiunilor proteice prin electroforeză?.Albuminele fiind în cantitatea cea mai mare şi avînd greutatea cea mai redusă(70.000-75.000) ce rol deosebit ar putea avea comparativ cu celelalte fracţiuni proteice?

C.Dozarea cantitativă a proteinelor serice refractometric.

Principiu:La baza refractometriei se află capacitatea pe care o au diferite medii a refracta razele de lumină care le străbat.O rază de lumină care trece dintr-un mediu în altul se refractă.Raportul dintre sinusul unghiului de incidenţă şi sinusul unghiului de refracţie poartă denumirea de indice de refracţie.Indicele de refracţie depinde de cantitatea,mărimea şi starea fizică a particulelor dizolvate,cît şi de temperatura mediului.

In lichidele biologice, mărimea indicelui de refracţie depinde de cantitatea de proteine.Sărurile şi alţi constituienţi

sanguini au un rol mai puţin important.

Material necesar: ser sau plasmă sanguină; refractometru.

Se utilizează diferite tipuri de refractometre. Descriem mai jos refractometru cu imersie Pulfrich-Zeiss (Fig.5)

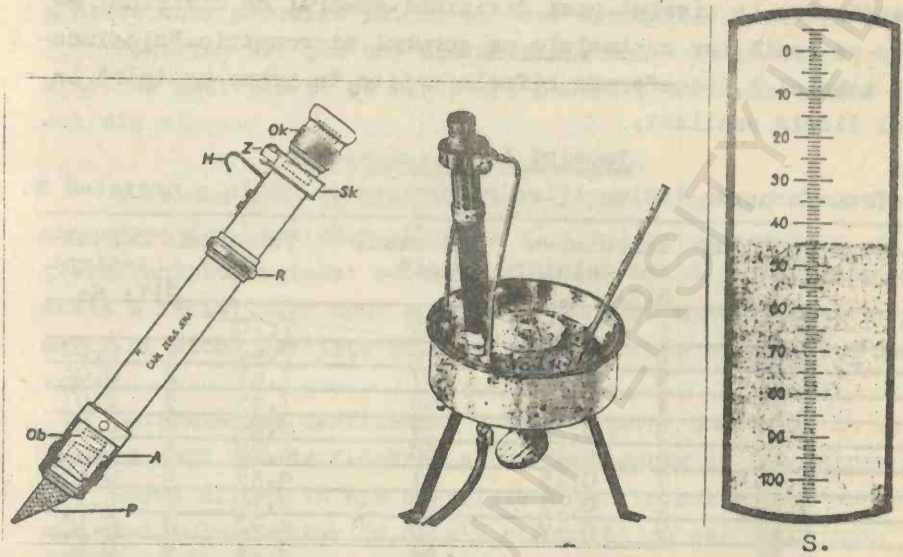


Fig.5. Refractometru de imersie Pulfrich şi scala(S) în momentul unei determinări.

El constă dintr-un tub optic prevăzut cu un obiectiv(Ob) cu un ocular (Ok) şi terminat cu prismele P. In aparat există o scală S divizată dela 0 la 100 din unitate în unitate, cu ajutorul căreea se citeşte limita dintre porţiunea luminoasă şi cea întunecată a cîmpului vizual. Refractometrul este prevăzut şi cu un compensator R, care înlătură dispersia luminii, evidenţiată printr-o margine colorată a liniei de despărţire la nivelul cîmpului luminat şi întunecat.

Refracţia se determină într-o baie de apă, care are o porţiune transparentă prin care trec razele de lumină, dirijate de o oglindă. Temperatura băii (17,5°C) se determină precis cu ajutorul termometrului anexat aparatului.

Modul de lucru: Se aduce temperatura apei din baie exact la 17,5°. Pe prisma externă, care prezintă o depresiune la mijloc se pune o picătură de ser de analizat şi se acoperă cu prisma P după care se fixează cu ajutorul unei garnituri speciale. Capătul de jos al refractometrului se cufundă în baia de apă pentru 10 minute, timp în care are loc egalizarea temperaturilor. Oglind-

băii se pune într-o poziţie care să reflecte lumina în prismă. Citim pe scala gradată numărul de diviziuni prin dreptul căreia trece linia de separare dintre cîmpul luminat şi întunecat.Cînd această linie cade între două diviziuni de pe scală,acţionăm asupra şurubului micrometric al aparatului(Z) şi aducem linia de despărţire la nivelul unei diviziuni.Numărul de diviziuni se citesc pe scală,iar zecimalele pe şurubul micrometric.Folosindune de tabelul 1,transformăm cifrele citite,în grame proteină la 100 ml lichid analizat.

Tabelul 1.

Transformarea indicaţiilor refractometrului în g.proteină %.

Diviziuni de pe scală.	Proteină g%	calcularea zecimalelor div.	g.	Diviziuni scală	Proteină g%	Calcul zecimal div.	g.
42	4,38	1	0,02	55	7,20		
43	4,60	2	0,04	56	7,42	1	0,02
44	4,81	3	0,06	57	7,63	2	0,04
45	5,03	4	0,08	58	7,85	3	0,07
46	5,25	5	0,11	59	8,06	4	0,09
47	5,47	6	0,13	60	8,28	5	0,11
48	5,68	7	0,15	61	8,49	6	0,13
49	5,90	8	0,17	62	8,71	7	0,15
50	6,12	9	0,19	63	8,92	8	0,17
51	6,34			64	9,14	9	0,20
52	6,55			65	9,35		
53	6,77			66	9,57		
54	6,98			67	9,78		

Cunoscînd cantitatea totală de proteină în g%,aflată refractometric şi procentul care revine fiecărei fracţiuni proteice,determinat electroforetic,se poate afla cantitatea fiecărei fracţiuni proteice în g % (Cum?) Prezentăm mai jos valorile normale pentru om(din Best şi Taylor 1966).

-Proteine totale.....6,03-6,72 g%
-Albumine .....3,32-4,04 "
-Globuline totale.....2,23-2,39 "
α-globuline .....0,79-0,84 "
β-globuline .....0,78-0,81 "
γ-globuline .....0,66-0,70 "
-Fibrinogenul .....0,34-0,43 "

Recomandări:se vor nota valorile obţinute şi se va compara cu valorile normale.

Intrebări de control:Pe ce se bazează metoda refractometrică de determinare a proteinelor sanguine?

4. DOZAREA IONILOR DE Na, K, Ca DIN SINGE.

Plasma sanguină a mamiferelor conţine o cantitate de aproximativ 0,9% substanţe anorganice. Ele realizează presiunea osmotică a sîngelui (aproximativ 7 atmosfere), au rol în polarizarea membranelor celulare şi în excitabilitate (Ca^{++}), în pH-ul umorilor(H^{+},OH^{-}), în reglarea activităţii unor enzime(Mg^{++}), în biosinteza unor proteine(Fe,Cu) şi unor hormoni(I) etc.

Descriem mai jos una din metodele folosite în mod curent în practica medicală şi de cercetare pentru determinarea unor cationi din sînge.

Fotometria cu flacără.

Este o metodă de analiză cantitativă, permiţînd determinarea concentraţiei metalelor alcaline şi alcalinoteroase dintr-o soluţie. Principiul metodei se bazează pe faptul că intensitatea luminoasă a radiaţiilor unui spectru de flacără este funcţie de numărul de atomi excitaţi şi deci de cantitatea elementului respectiv.

Determinarea cantitativă a substanţelor solubilizate se realizează după metoda flăcării a lui Lungegartg şi Lehunnknecnt.

Serul diluat în apă distilată este fin pulverizat cu ajutorul unui pulverizator de sticlă alimentat cu aer comprimat; amestecul aerosol-gaz este condus într-un arzător cu o anumită structură, unde se face aprinderea amestecului acetilenă-aer. Selecţionînd cu ajutorul unui filtru de interferenţă liniile spectrale ale elementului căutat, lumina flăcării cade pe o celulă fotoelectrică, al cărei fotocurent se măsoară prin intermediul unui galvanometru.

Modul de funcţionare a aparatului. Pentru a se obţine rezultate corecte, este necesar să se menţină constante condiţiile de funcţionare a aparatului şi a flăcării, concentraţia soluţiei apărînd ca singura variabilă. Prin intermediul reductorilor se realizează o relaţie constantă între presiunea acetilenei şi a aerului comprimat. Presiunile acetilenei şi ale aerului comprimat sînt redate de manometrul fin pentru aer şi de manometru cu apă pentru acetilenă. In timpul lucrului se deschide iniţial manometrul pentru aer şi apoi manometrul pentru acetilenă.

Substanţa lichidă este aspirată prin duza de lichid (R Fig. 6) în urma vidului produs de duza pentru aer comprimat. Bila de sticlă, aflată în imediata apropiere a duzelor pentru aer şi lichid, realizează reducerea particulelor de lichid produse prin pulveri-

zare.Picăturile mai mari din curentul de ceaţă sînt condensate, încît numai o ceaţă fin dispersată ajunge în brenner(arzător) (3).Acetilena se racordează la camera de amestec, trecînd apoi la brenner.Brennerul este legat de pulverizator prin intermediul camerei de amestec(5).

Partea optică constă dintr-o oglindă concavă(4),un condensator special cu diafragmă(7),un fotoelement cu seleniu(6),un geam mat.Oglinda concavă concentrează lumina flăcării şi o proiectează pe celula fotoelectrică cu seleniu.Compensatorul special prevăzut cu lentile micşorează reflexia şi creează o utilizare cît mai mare a luminii.Cu ajutorul diafragmului iris,luminozitatea poate fi scăzută sau crescută,în aşa fel încît oscilaţiile galvanometrului să se găsească în cîmpul de măsurare cel mai favorabil.

Filtrul trebuie să aibă o permeabilitate mare pentru lumina emisă de proba de examinat şi impermeabilitate pentru lumina dată de elementele străine pe care le conţine proba.

Celula fotoelectrică trebuie să fie sensibilă pentru un domeniu larg de lungimi de undă; deschiderea şi închiderea ei sînt realizate cu un declanşator automat(1).

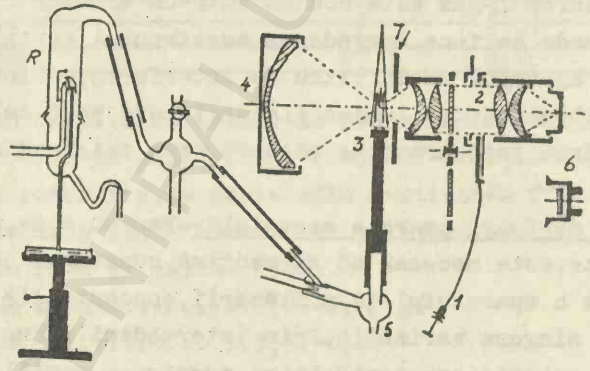


Fig. 6. Schema de funcţionare a fotometrului cu flacără (explicaţii în text).

Galvanometrul cu scală indică valorile date de fotocelulă.

Metoda de lucru. Se deschide robinetul bombei de aer comprimat şi se reglează presiunea astfel încît manometrul fin să arate o presiune de 0,2-0,3 atmosfere.

Se deschide treptat butelia cu acetilenă şi se reglează

presiunea pînă la o diferenţă de nivel între cele două colcane cu apă de 30-40mm.

După 10 secunde, timp în care se realizează o omogenizare a acetilenei cu aerul comprimat, se aprinde amestecul gaz-aerosol la duza lămpii. Flacăra trebuie să fie rigidă, iar conul flăcării deasupra duzei să aibă o înălţime de 2-3mm.

Pentru a obţine măsurători reale, trebuie create condiţii de excitaţie optimă şi constantă, stabilind raportul favorabil de presiuni între acetilenă şi aerul comprimat. După aceasta se lasă aparatul deschis timp de 20 minute, pulverizînd o soluţie de concentraţie medie, cu filtrul interpus pentru a crea o constanţă a celulei fotoelectrice.

Se controlează punctul „0" al galvanometrului; diafragma trebuie deschisă la 2/3-3/4 din diametrul său total.

Se determină apoi valoarea solventului, apă distilată, care trebuie scăzută din toate valorile măsurate.

Stabilirea curbei etalon. Se începe cu pulverizarea soluţiilor mai diluate. Indicaţiile galvanometrului se înregistrează pe abscisă iar concentraţiile soluţiilor-pe ordonată. Forma curbei diferă funcţie de ionul care se studiază. Avînd în vedere existenţa ionilor perturbatori din serul sanguin, este indicat să se lucreze cu soluţii etalon care să corespundă compoziţiei sanguine. După trasarea curbei etalon se trece la măsurarea soluţiei de analizat.

După terminarea determinărilor, se închide iniţial robinetul acetilenei, apoi aerul comprimat. Toate accesoriile aparatului se readuc la zero.

Determinarea sodiului.

-Soluţia etalon: 25,4181 g NaCl sînt dizolvate în 1000ml apă. 1 ml din această soluţie conţine 10 mg Na.

Pentru trasarea curbei etalon se folosesc 3 soluţii cu concentraţie diferită a sodiului:

-soluţia 1 conţine 2,5 ml soluţie etalon + 97,5 ml apă.

-soluţia a doua conţine 3 ml soluţie etalon + 97 ml apă

-soluţia a treia conţine 3,5 ml etalon + 96,5 ml apă.

Curba obţinută pentru sodiu nu este liniară.

Proba de cercetat: 1 ml ser sanguin se diluează de 100 ori iar soluţia obţinută se analizează identic cu etalonul. Valorile obţinute la galvanometru cu filtrul pentru Na, sînt raportate la curba etalon.

Determinarea potasiului.

Soluţia etalon:0,9551 g ClK dizolvate în 1000 ml apă.Soluţia conţine 5 mg K pe ml.Soluţia solvent conţine 1,3875 g Cl_2Ca + + 41,96 g ClNa dizolvate în 1000 ml apă.

Din soluţia etalon se fac următoarele diluţii:

-1 ml soluţie etalon + 1 ml solvent se aduc la 100 ml

-2 ml soluţie etalon + 1 ml solvent adus la 100 ml soluţie

-3 ml soluţie etalon + 1 ml solvent adus la 100 ml.

Curba obţinută este liniară.

Proba de cercetat: 1 ml ser se diluează de 20 ori.Diluţia probei se pune în vasul Petri pentru a fi pulverizată,iar valoarea citită este raportată la curba etalon.

Determinarea calciului.

Se prepară trei soluţii etalon:

-soluţia 1 conţine 0,125 g $CaCO_3$ + 50 ml HCl +7,88 g NaCl+ +0,360 g KCl dizolvate în 1000ml apă.Soluţia conţine 5mg Ca la % ml;

-soluţia a II-a conţine 0,250 g CO_3Ca+ 50 ml HCl+7,88 g NaCl + 0,360 g KCl +1000 ml apă = 10 mg Ca%.

-soluţia a treia conţine 0,375 g $CaCO_3$+50ml HCl+7,88 g NaCl + 0,360 g KCl +1000 ml apă =15 mg Ca%.

Toate cele trei soluţii se diluează de 20 ori şi servesc la trasarea curbei etalon.

Proba de cercetat:1 ml ser se diluează de 20 ori cu apă distilată.Valorile citite la galvanometru,cu filtrul pentru Ca,sînt reportate la curba etalon.

Recomandări:De notat valorile obţinute şi de comparat cu valorile normale.

Intrebări de control:Care este principiul de funcţionare a flamfotometrului? Ce rol îndeplinesc ionii din sînge?

BCU IASI/CENTRALA UNIVERSITARA LIBRARY

5.NUMARAREA ELEMENTELOR FIGURATE ALE SINGELUI.

Principiu:Determinarea numărului de elemente figurate din sînge sau alte lichide biologice,se bazează pe numărarea directă, la microscop,a celulelor dintr-un volum cunoscut de lichid,care a fost diluat în prealabil într-o proporţie cunoscută.Diluarea prealabilă a sîngelului este necesară în vederea evitării coagulării lui şi permiterea numărării elementelor figurate,care sînt foarte numeroase.

A.Numărarea eritrocitelor.

Material necesar:lichid de diluţie;pipete de diluţie;hemocitometre;microscop;ace pentru puncţie;alcool;eter;vată.

-Lichidul de diluţie.El trebuie să îndeplinească următoarele calităţi:a)-să fie izotonic,pentru a nu produce hemoliza sau ratatinarea eritrocitelor; b)-să conţină un fixativ,care să conserve forma eritrocitelor şi să împiedice autoliza şi aglutinarea lor.Se utilizează diferite lichide de diluţie:

-Lichidul Hayem: clorură de sodiu.....1 g
sulfat de sodiu.....5 g
sublimat .....0,5 g
apă distilată.....100 ml.

Soluţia se filtrează prin hîrtia de filtru.Pentru a obţine rezultate bune soluţia nu trebuie să fie mai veche de 3 săptămîni.In cazuri de disproteinemii această soluţie poate produce precipitarea proteinelor şi aglutinarea eritrocitelor,împiedicînd numărarea lor.Acelaşi lucru se poate întîmpla în cazuri de ciroze şi pneumonii atipice.

-Lichidul Gowers: sulfat de sodiu.....12,5 g.
acid acetic glacial....33,3 ml.

Acest lichid este superior soluţiei Hayem, deoarece împiedică formarea rulourilor de eritrocite în disproteinemii.

-Ca lichid de diluţie se poate folosi şi serul fiziologic.

-Pipeta pentru diluţia eritrocitelor conţine în total 101 volume din care 1 volum revine capilarului, subdivizat în 10 unităţi egale cu înscripţia 0,5 şi 1 iar 100 volume revin bulei de diluţie în care se află o bilă de culoare roşie(Fig.8).La partea de sus a pipetei se adaptează un tub de cauciuc,care permite o aspiraţie uniformă a lichidelor.Dacă sîngele este tras în tubul capilar pînă la diviziunea 0,5 sau 1 şi apoi completat cu lichidul de diluţie pînă la notaţia 101, se obţine o diluţie a sîngelui de 200 şi respectiv 100 ori.De unde rezultă acest calcul?

După întrebuinţare pipetele se spală cu apă,apoi cu alcool şi eter,se usucă,se sterilizează la căldură uscată.

-Hemocitometre.Ele sînt formate dintr-o lamă de sticlă groasă, care are gravată pe ea o reţea cu dimensiuni cunoscute.Zona lamei pe care se află reţeaua gradată,se găseşte la o adîncime de 0,1 mm faţă de restul lamei,aşa încît atunci cînd acoperim camera cu o lamelă(L) ea delimitează un spaţiu înalt de 1/10mm. In acest spaţiu pătrunde sîngele diluat,iar globulele se dispun pe un singur strat permiţînd numărarea lor (Fig.7).

Orice hemocitometru are gravat pe el tipul lamei,înălţimea camerei(obişnuit 0,1mm),suprafaţa pătratului mic(1/400mm^2) şi suprafaţa pătratului mare(1/25mm^2).Descriem mai jos cîteva tipuri de camere mai des folosite(Fig.9)

-Camera Thoma:Reţeaua lamei Thoma are latura de 1mm şi suprafaţa de 1mm^2.Suprafaţa este subdivizată prin linii triple în 16 pătrate de ordinul al 2-lea cu suprafaţa de 1/25mm^2,care la rîndul său sînt subdivizate prin linii simple în 16 pătrate de ordinul 3 cu suprafaţa de 1/400 mm^2.

-Camera Bürker:Are o suprafaţă de 9mm^2 împărţită în 9 pătrate de cîte 1 mm^2 delimitate prin linii triple.Fiecare mm^2 este subdivizat prin linii duble în 16 pătrate cu suprafaţa de 1/25mm^2. La întretăierea liniilor duble se înscriu pătrate mici,cu suprafaţa de 1/400 mm^2.

-Camera Bürker-Türck:Are o suprafaţă de 9mm^2 gravată după tipul Bürker,combinat cu tipul Thoma.Partea centrală a reţelei în formă de cruce,este de tipul Thoma, iar colţurile-de tipul Bürker.

-Camera Goreaev:Are un cadrilaj în care alternează cîte un grup de 16 pătrate cu suprafaţa de 1/400,cu grupuri de pătrate cu suprafaţa de 1/25mm^2.

La toate tipurile de lame,pătratele cu suprafaţa de 1/400 se folosesc pentru numărarea eritrocitelor, iar cele cu suprafaţa de 1/25 mm^2-pentru numărarea leucocitelor.

-Lamela cu care se scoperă camera, este o piesă precis calibrată.Mărimea ei este de 22/23mm, marginile rotunde iar grosimea în medie de 0,4 mm.Lamele de histologie fiind subţiri şi neşlefuite pot modifica spaţiul de 1/10mm în care pătrunde sîngele diluat.

Curăţirea camerei şi a lamelei se face imediat după utilizare, prin spălare cu apă rece sau călduţă.Dacă s-a uscat sîn-

gele pe lamă,se spală cu apă călduţă şi săpun,se clăteşte cu apă de robinet şi se usucă la temperatura camerei sau se şterge cu o cîrpă ce nu lasă scame.După curăţire camera şi lamela se apucă numai de margini.

-Microscopul:se lucrează cu obiectiv uscat mare 40,ocular 10 sau 7, lumină slabă.

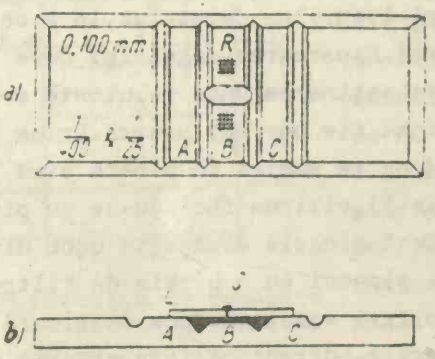


Fig.7. Hemocitometru.a-privire din faţă b-privire din profil.R=reţea L=lamelă,S=înălţimea camerei.

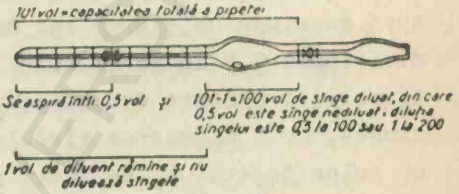


Fig.8
Pipetă pentru eritrocite.

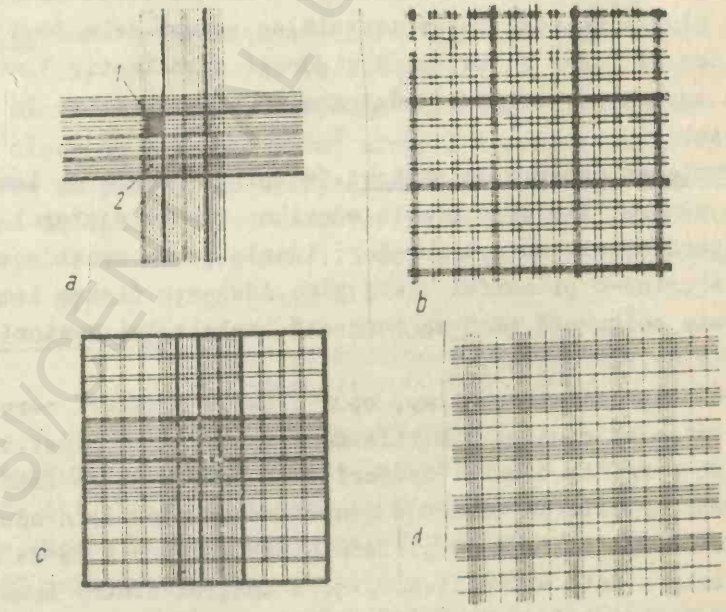


Fig 9. Tipuri de reţele de numărat hematii.
a-Thoma; b-Bürker; c-Bürker-Türck; d-Goreaev. 1-pătrat mare; 2-pătrat mic

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Recoltarea sîngelui.Se şterge degetul mîinii stîngi(inelar sau mijlociu) cu alcool şi eter pentru dezinfecţie şi îndepărtarea grăsimii .Cu un ac de seringă flambat şi şters cu alcool în prealabil,se face o înţepătură în pulpa degetului înspre partea laterală care este mai puţin sensibilă şi printr-o lovitură bruscă,unică.Adîncimea înţepăturii trebuie să fie suficient de profundă, încît sîngele să se scurgă din rană spontan sau cel mult după o uşoară presiune de-a lungul laturilor degetului,la o oarecare distanţă de locul înţepăturii.Stoarcerea degetului duce la diluarea sîngelui cu limfă şi la obţinerea unor rezultate eronate.Pielea din jurul înţepăturii să fie perfect uscată.Prima picătură de sînge se şterge iar a doua se aspiră în pipetă pînă la diviziunea 0,5(in anemii pînă la 1),citirea făcîndu-se cu pipeta în poziţia aproape orizontală.Dacă sîngele depăşeşte uşor diviziunea, prin atingerea vîrfului pipetei cu o hîrtie de filtru sau cu pulpa degetului, se poate potrivi exact coloana de lichid la diviziunea dorită.Se şterge sîngele aderent pe faţa externă a pipetei şi se aspiră foarte rapid lichidul de diluţie pînă la diviziunea 101.Cînd ampula pipetei este aproape plină,pipeta se ţine în poziţia verticală,pentru a aduce lichidul exact la semn.Se aşează pipeta în poziţia orizontală,se astupă cele două capete cu police şi index şi se agită viguros(aproximativ 3 minute) pentru omogenizare.Pînă la numărătoare pipeta rămîne în poziţie orizontală.

Umplerea camerei de numărat.Se aplică lamela pe lama celulei de numărat,fie prin simpla adeziune,fie cu ajutorul cavalerilor.Dacă celula nu are cavaleri,lamela se va umezi uşor la margini, aburind-o şi astfel aderă bine.Aderenţa dintre lamă şi lamelă este asigurată cînd se formează inelele lui Newton(inele colorate de refracţie).

Se agită pipeta un timp, apoi primele picături care se scurg sînt lăsate să cadă pe o hîrtie de filtru.Vîrful pipetei se apropie de marginea camerei acoperită cu lamela şi se lasă să intre prin capilaritate în cameră o cantitate de lichid,în spaţiul de 1/10 mm format între lamă şi lamelă.Este de dorit ca să se introducă dintr-o dată atîta lichid,încît spaţiul dintre lamă şi lamelă să fie umplut în întregime, fără ca lichidul să treacă în şanţurile laterale, fără să intre bule de aer în cameră; în caz contrar, operaţia se repetă după ştergerea camerei.Se ia camera

umplută cu proba de sînge şi fără s-o înclinăm se aşează pe platina microscopului,lăsînd cîteva minute pentru stabilizarea eritrocitelor.

Numărarea eritrocitelor.Se numără elementele ce se găsesc în pătratele cu suprafaţa de 1/400 mm^2.Numărarea urmează direcţia săgeţii (fig.10) .Datorită răspîndirii neuniforme a hematiilor pe reţeaua de numărat,pentru a avea o valoare medie a hematiilor ce se găsesc pe o suprafaţă de 1/400 mm2 şi o înălţime de 1/10mm(un volum de 1/4000 mm^3), se comandă a se număra hematiile pe 80 pătrate cu suprafaţa de 1/400mm^2,ceeace corespunde la 5 pătrate cu suprafaţa de 1/25mm^2. Se aleg pătratele care nu sînt situate în acelaşi rînd,ci răspîndite pe întreaga reţea.La nivelul fiecărui pătrat mic se numără globulele situate în pătrat şi pe două laturi,de exemplu sus şi stînga.

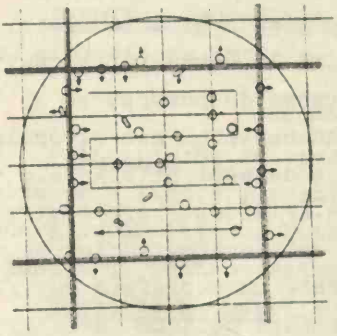


Fig.10. Direcţia de numărare şi soarta globulelor de pe liniile marginale.

Calculul.Suma eritrocitelor obţinute de pe cele 80 pătrate se împarte la 80, iar valoarea rezultată indică numărul mediu de hematii dintr-un volum de 1/4000mm^3 de sînge diluat.Numărul hematiilor dintr-un volum de 1 mm^3 sînge integral se află înmulţind media cu 4000 şi cu diluţia corespunzătoare, sau mai simplu: cînd diluţia este de 1/200,cifra de eritrocite,găsită pe 80 pătrăţele,se înmulţeşte cu 10.000 (de ce?) şi aflăm numărul de eritrocite pe mm^3 sînge integral.

Rezultate normale:-bărbat:4.500.000-5.000.000/mm^3
-femeie:4.200.000-4.500.000/mm^3
-nou-născut:5.000.000-6.000.000/mm^3

B.Numărarea leucocitelor.

Principiu:Sîngele este diluat într-o pipetă specială,cu un lichid de diluţie,care lizează eritrocitele,păstrînd numai leucocitele,cărora le colorează nucleul.Numărarea se face după acelaşi principiu ca la eritrocite.

Material necesar:pipeta pentru diluţia leucocitelor;lichid de diluţie,hemocitometru;microscop.

Pipeta de diluţie pentru leucocite,conţine în total 11 vo-

lume din care un volum revine capilarului subdivizat în 10 şi 10 volume se află în bula de diluţie.Bila de homogenizare este de culoare albă.Diluţia sîngelui recoltat pînă la 0,5 este de 1/20 iar recoltat pînă la 1-de 1/10.

Lichid de diluţie(Türck):-acid acetic glacial....2ml
-albastru de metilen 1%....cîteva picături
-apă distilată.....100 ml.

Tehnică:Se recoltează sîngele în pipetă pînă la diviziunea 0,5 şi se aspiră lichid de diluţie pînă la semnul 11.Se agită pipeta timp de 3 minute.Se încarcă camera de numărat ca şi la eritrocite.Utilizăm obiectivul 40,condensatorul microscopului coborît.Trebuie să fim atenţi pentru a deosebi artefactele şi resturile citoplasmatice,de leucocite.Artefactul are o structură amorfă,iar leucocitul-o structură celulară(cu nucleu şi citoplasmă).Numărarea lor se face pe pătrate cu suprafaţa de $1/25mm^2$. Se recomandă a se număra de pe o suprafaţă de 5 mm^2,deci 125 pătrate cu suprafaţa de $1/25mm^2$.Cifra găsită se împarte la 5 şi găsim numărul de leucocite care se află într-un volum de $0,1mm^3$ sînge diluat. Înmulţind această cifră cu 10 şi diluţia respectivă,aflăm numărul de leucocite dintr-un mm^3 sînge.

Rezultate normale la om:-adult:4000-9000/mm^3(media 6800)
-sugar:8000-12000
-nou-născut:12000-20.000/mm^3

C.Numărarea eozinofilelor.

Principiu:Sîngele recoltat este amestecat cu o soluţie de acetonă-eozină, care distruge celelalte celule,păstrînd numai eozinofilele,pe care le colorează slab.Numărătoarea se face în camera Nageotte sau hemocitometru obişnuit.

Reactivul acetonă-eozină este compus din:soluţie apoasă de eozină 2%---5ml;acetonă----5ml şi apă distilată---90ml.Soluţia se conservă în frigider la 4^oC,se filtrează înainte de folosire; nu se poate folosi după 15 zile dela preparare.

Tehnica:Se recoltează sîngele cu pipeta pentru leucocite pînă la diviziunea 1 după care se completează pînă la 11 cu soluţia acetonă-eozină.Agităm de 30 ori pipeta si după 3 minute se umple camera de numărat.Pentru agitare se recomandă a se mişca încet pipeta dintr-un sens în altul.Pînă la numărătoare nu trebuie să treacă mai puţin de 1,5 minute şi nici mai mult de 5 minute,deoarece cu timpul se distrug şi eozinofilele.

Eozinofilele,cu granulaţiile lor strălucitoare,se disting net pe fondul colorat roz,în timp ce restul leucocitelor se văd ca nişte umbre.

Se recomandă numărarea eozinofilelor de pe o suprafaţă de 5mm^2.Calculul este identic ca la leucocite.

Numărarea eozinofilelor este una din metodele folosite pentru evaluarea activităţii corticosuprarenalei(testul Thorn).

Rezultate:Normal se găsesc cifre care variază între 100 şi 200 elemente pe mm^3.

D.Numărarea trombocitelor.

Principiu:Se folosesc soluţii de diluţie,care au proprietatea de a liza eritrocitele şi de a împiedica aglutinarea spontană a trombocitelor.Numărătoarea se face în hemocitometrele folosite şi pentru eritrocite.

Reactivi necesari:Soluţie Feissly:

-clorhidrat de cocaină....4g
-clorură de sodiu.....0,02g
-apă distilată.....100ml

Tehnica:Intr-o pipetă de leucocite se aspiră sînge pînă la diviziunea 0,5 şi soluţie Feissly pînă la semnul 11(diluţia 1/20).Se agită bine.După aruncarea primelor picături din pipetă, se încarcă camera de numărat. Se aşteaptă 20 minute pentru sedimentarea trombocitelor şi liza eritrocitelor.Se examinează la microscop cu contrast de fază dar se poate folosi şi un microscop obişnuit,coborînd condensatorul şi realizînd un cîmp întunecat(cenuşiu).

Trombocitele ne apar ca mici sfere,strălucitoare şi mobile. Deoarece trombocitele,care au 2-4 µ, înnoată la diverse niveluri în spaţiul de 1/10mm, este necesar ca pe timpul numărării să mişcăm viza micrometrică,pentru a număra toate celulele de pe reţea.In cîmp mai apar şi eritrocitele,care n-au fost lezate, dar care nu jenează numărătoarea trombocitelor.Se numără trombocitele de pe mai mulţi mm^2 şi se raportează la 1mm^3,calculul făcîndu-se ca la numărătoarea eritrocitelor.

Numărul de trombocite reflectă în general, activitatea măduvei osoase.

Valori normale la om:150.000-400.000/mm^3.

Recomandări: Se va desena reţeaua hemocitometrului folosit şi se vor compara rezultatele obţinute cu cele normale.

Intrebări de control:Pe ce se bazează numărarea elementelor figurate din lichidele biologice?Putem folosi soluţia Türck pentru numărarea eritrocitelor iar soluţia Hayem- pentru leucocite?Indicaţi cîteva situaţii, care produc modificări fiziologice ale numărului elementelor figurate.

6.DETERMINAREA CANTITATIVA A HEMOGLOBINEI.

Hemoglobina reprezintă aproximativ 95% din greutatea uscată a eritrocitului.Funcţia de bază a hemoglobinei constă în primul rînd în transportul oxigenului şi în mai mică măsură - în transportul CO_2 sau echilibrul acido-bazic al corpului.

Există cîteva metode de determinare a hemoglobinei în sînge,care pot fi împărţite astfel:

1.Gazometrice cu determinarea O_2 sau a CO,folosind aparatul van Slyke,Warburg.1 g de hemoglobină(Hb)=1,34 $ml O_2$.

2.Chimice(dozarea Fe:1 mg Fe=0,288g Hb;1g.Hb=3,34mg Fe)

3.Colorimetrice:

a.Hematină alcalină(King) sau acidă(Sahli,Fisher)

b.Oxihemoglobină(Hellige,Colleman)

c.Hemoglobină redusă(Heilmeyer)

d.Cianhemoglobină

e.Cianmethemoglobină(Drabkin)

4.Spectrofotometrice (Atlas,Colleman,Beckman)

Dintre aceste metode, unele(gazometrice,chimice şi spectrofotometrice) sînt precise, dar laborioase şi servesc la obţinerea standardelor primare de Hb;altele(colorimetrice) sînt simple ca tehnică şi aparatură şi au o largă aplicaţie clinică.

A.Dozarea hemoglobinei cu ajutorul colorimetrului Sahli.

Principiu:Se compară colorimetric o soluţie de clorhidrat de hematină obţinută din sîngele de cercetat,cu un etalon făcut din sticlă maron.

Material necesar:Hemoglobinometru; pipetă de 20mm^3;pipetă Pasteur; baghetă de sticlă pentru amestec; acid clorhidric N/10

Hemoglobinometru este format dintr-un tub gradat special

pentru dozarea hemoglobinei.Tubul are două gradaţii:una în grame la 100 ml sînge, alta în procente faţă de normal.Acest tub gradat este montat într-un comparator, între două prisme etalon sau două baghete de sticlă etalon,colorate (Fig.11).

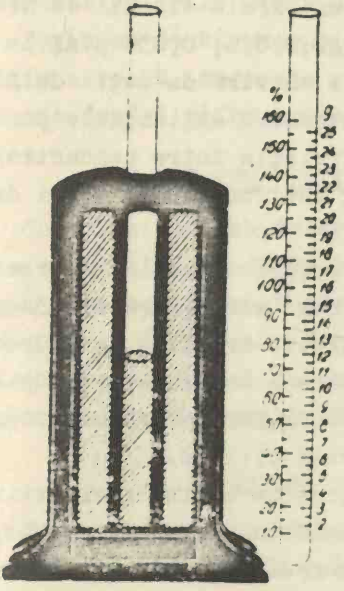


Fig.11 Hemoglobinometrul şi tubul său gradat.

Tehnica:Se pune în tubul gradat HCl N/10 pînă la diviziunea 10 de pe scara Hb%.După aceasta se înţeapă pulpa degetului, se aspiră sîngele în pipeta hemoglobinometrului pînă la semn.Se şterge la exterior vîrful pipetei după care o introducem în fundul eprubetei gradate pînă ce atinge suprafaţa lichidului.Sîngele cade la fund iar stratul de lichid de deasupra rămîne transparent.Pentru a nu sufla aer în lichid şi a produce în acest fel spumă, se lasă la extremitatea pipetei o coloană de sînge cam de 1mm înălţime, se scoate pipeta din lichid şi se elimină restul de lichid (sînge) pe peretele eprubetei imediat deasupra nivelului de lichid.Înclinînd uşor eprubeta, sîngele depus pe perete este scurs spre masa lichidă.Se clăteşte pipeta prin spălare de 2-3 ori cu HCl din eprubeta gradată.Ţinînd eprubeta între două degete de partea ei superioară, o lovim în partea inferioară cu degetele celeilalte mîini, pentru a amesteca în felul acesta sîngele cu soluţia de acid.Se aşteaptă 10 minute, timp în care amestecul se închide la culoare datorită formării clorhidratului de hematină de culoare brună.Cu pipeta Pasteur adăugăm cu picătura apă distilată şi omogenizăm amestecul cu bagheta (sau cu pipeta Pasteur).Culoarea obţinută se compară cu etalonul din comparator.Cînd nuanţele sînt egale,se citeşte concentraţia hemoglobinei în g% la nivelul meniscului inferior al lichidului.Citirea se face la lumina zilei;lumina artificială dă erori.Se recomandă exprimarea rezultatelor în grame/100 ml sînge(g%), sau miliechivalenţi la litru.Exprimarea în unităţi procentuale este necorespunzătoare şi trebuie părăsită.

B.Dozarea fotometrică a hemoglobinei (Heilmeyer).

Material necesar: Fotometru; hemoglobină pură pentru etalonare;soluţie amoniac 0,4%; hidrosulfit de sodiu cristale;pipetă de hemoglobină;pipetă de 1 ml.

Stabilirea curbei etalon.Se face o soluţie stoc de hemoglobină 1%.Din această soluţie se fac următoarele diluţii de hemoglobină în apă amoniacală 0,4%: 0,01 g%;0,02%; 0,03% pînă la 0,1%.Se adaugă apoi în fiecare soluţie un vîrf de cuţit de hidrosulfit de sodiu şi se citesc la fotometru extincţiile pentru fiecare diluţie.Reprezentată grafic, relaţia între concentraţia hemoglobinei şi extincţie se prezintă sub forma unei linii drepte.

Dozarea în sînge:după înţeparea pulpei degetului se recoltează cu pipeta hemoglominometrului 20mm^3 sînge,care se adaugă în 1,98 ml apă amoniacală.Se adaugă cîteva cristale de hidrosulfit de Na şi se agită din nou;se produce o modificare a culorii din cărămiziu în albastru roşietic,dovada formării hemoglobinei reduse.In acest moment trebuie efectuată citirea.

Se fotometrează în cuva de 5mm grosime contra apei.Extincţia obţinută se transformă în g. hemoglobină la sută, pe baza curbei etalon, ţinînd cont de diluţia realizată(100 ori).

Metoda prezintă avantajul de a doza şi fracţiunea methemoglobinică.Eroarea metodei este de aproximativ $\pm$ 2%.

Valori normale:-bărbat: 14-18 g%

-femeie: 12-16 g%

Recomandări:De notat rezultatele obţinute şi de comparat cu valorile normale.

Intrebări de control:Care este cantitatea de hemoglobină din sîngele circulant?

Indici derivaţi.

a.Hemoglobina eritrocitară medie(HEM), reprezintă concentraţia medie în hemoglobină a eritrocitului.Se calculează după următoarea formulă: $HEM = \frac{Hb(g\ \%) \times 100}{\text{hematocrit.}}$

De exemplu:o probă care are 15g%Hb şi hematocritul 45,ne dă o valoare a HEM de 33%.Valorile normale variază între 32-34%.Concentraţia Hb nu depăşeşte 34% cînd volumul eritrocitar creşte, de aceea nu există hipercromie.In microcitoză şi hipocromie concentraţia scade la 28-25%.

b.Valoarea globulară(indice de culoare)exprimă conţinutul mediu de Hb al unui eritrocit,comparat cu conţinutul unui eritrocit normal.El rezultă din următorul raport:

$$v.g.=\frac{Hb\%}{Nx\ 2}$$ în care N reprezintă primele două cifre ale numărului de eritrocite pe mm^3.Valoarea globulară normală este cuprinsă între 0,85-1,15;valorile globulare sub 0,85= hipocromie;valorile globulare peste 1,15=hipercromie.

Noţiunea de hipercromie dată de valoarea globulară,nu este o noţiune reală, deoarece concentraţia hemoglobinei în eritrocit nu poate depăşi cifra normală de 34%.

7.PROPRIETATILE PIGMENTILOR RESPIRATORI.

Capacitatea lichidelor biologice de a înmagazina şi transporta oxigenul depinde de prezenţa compuşilor proteici coloraţi, denumiţi pigmenţi respiratori.In cele ce urmează vor fi studiate două caracteristici ale lor:capacitatea de oxigen a lichidelor biologice şi spectrul de absorbţie al pigmenţilor respiratori şi a unora din derivaţii săi.

A.Capacitatea de oxigen a lichidelor biologice.

Capacitatea lichidului biologic de a absorbi oxigenul, este denumită capacitatea de oxigen, care este proporţională cu cantitatea de pigment respirator.In cazul hemoglobinei ea este egală cu 1,34 ml O_2 pentru fiecare gram de Hb.

Principiu:o cantitate determinată de sînge sau hemolimfă este pusă în contact cu oxigenul pentru fixarea maximă a gazului de către pigmentul respirator, după care are loc dislocarea gazului de pe pigment în sisteme închise de reacţie,care permit evaluarea manometrică a cantităţii de gaz degajate.

In cazul aparatului Warburg se introduce în vasul de reacţie o cantitate de sînge bine oxigenat,împreună cu un absorbant de CO_2 şi saponină pentru hemoliza eritrocitelor.Lichidul care va disloca O_2 de pe pigmentul respirator, este plasat în diverticulul lateral al vasului de reacţie,după care ataşăm vasul de reacţie la manometrul aparatului Warburg şi-l introducem în baia termostat a aparatului.După uniformizarea temperaturilor (din baie şi vas reacţie), se amestecă soluţiile între ele, iar O_2 degajat este măsurat manometric.

Material necesar:aparat Warburg;eprubete;heparină;fericianură de K 2%;soluţie de amoniac;saponină 0,3%;KOH 15%.

Sîngele se colectează pe heparină şi se agită într-o eprubetă de testat sau în seringă în vederea oxigenării.Se va folosi 0,5ml sînge de mamifer sau pasăre;1 ml sînge de vertebrat poikiloterm(broască sau peşte);2 ml-dela nevertebrate(homar sau crab).

Oxigenul poate fi eliberat de pe hemoglobină sau clorocruorina policheţilor cu fericianura de K 2% care transformă Hb în methemoglobină-compus în care Fe hemului este sub forma ferică şi nu se mai combină cu oxigenul.De pe hemocianină,oxigenul poate fi eliberat cu hidrosulfit de Na ($Na_2S_2O_4.2H_2O$).

Tehnica: In compartimentul de bază al vasului de reacţie, se introduc 2 ml soluţie de amoniac (9ml soluţie concentrată la litru), cantitatea de sînge indicată mai sus,şase picături de saponină 0,3%.In diverticulul lateral se introduc 0,5 ml fericianură de potasiu sau de hidrosulfit de sodiu în cazul hemocianinei(hemocianina se poate obţine dela crab,homar sau rac.).

Se ataşează vasul de reacţie la manometru şi se introduce în aparatul Warburg pentru 10 minute,robinetul de pe ramul manometric stîng,comunicînd cu exteriorul.După aceasta aducem lichidul manometrului din ramul stîng (care comunică cu vasul) la punctul zero(150 sau 200) şi se citeşte nivelul lichidului din ramul drept.Se închide comunicarea cu exteriorul.Apăsînd cu degetul mare pe partea dreaptă a ramului manometrului (pentru a evita scurgerea soluţiei Brodie),se scoate manometrul cu vasul de reacţie din baia termostat şi se transvazează fericianura de K din diverticulul lateral, în vasul principal.Se introduce din nou în baie după care se ia degetul de pe ramul liber al manometrului.Se agită cîteva minute pînă se stabileşte echilibrul. Se aduce din nou nivelul lichidului manometric în ramul stîng la punctul zero şi se înregistrează presiunea în ramul drept, în mm soluţie Brodie.Cantitatea de gaz degajată se calculează după formula: X=h x C, în care X=mm^3 O_2 degajat;h= denivelarea citită la manometru în mm, iar C=constanta manometrului respectiv, ce se obţine cu ajutorul formulei Barckroft-Warburg:

$$C=\frac{(V_t-V_l)\frac{273}{T}+V_l\alpha}{10.000}$$

în care V_t=volumul spaţiului

de reacţie; V_1=volumul lichidelor folosite în sistemul de reacţie; T=temperatura absolută a băii termostat; α=coeficientul lui Bunsen, pentru exprimarea solubilităţii gazelor în lichide funcţie de temperatură.

Rezultatul se exprimă în ml oxigen la 100 ml sînge.

B. Spectrul de absorbţie al hemoglobinei şi a unora din derivaţii săi.

Hemoglobina este aptă de a se combina cu unele gaze, formînd compuşi labili, uşor disociabili. Combinarea ei cu oxigenul se datorează Fe pe care îl conţine. Fiecare moleculă de Hb se combină cu 4 molecule de O_2. Combinaţia este foarte labilă, Fe rămînînd sub forma feroasă. Globina este aceea care conferă componentei fier-pigment a hemoglobinei, proprietatea deosebită de a forma combinaţii laxe cu oxigenul. Hb oxigenată în acest fel este - noscută sub denumirea de oxihemoglobină.

Termenul de hemoglobină redusă sau ferohemoglobină este dat moleculei în cazul cedării oxigenului.

Methemoglobina sau ferihemoglobina apare în urma acţiunii agenţilor oxidanţi, cînd Fe este oxidat transformîndu-se în Fe feric. Methemoglobina este deci un compus de hem oxidat cu o globină naturală, deosebindu-se astfel de cathemoglobină, care este un hem feric+ globina denaturată şi de hemocromogen în care globina este denaturată, dar fierul se găseşte sub formă feroasă.

Hemoglobina redusă se combină cu hidrogenul sulfurat, formînd sulfhemoglobină. Cu excepţia unor cazuri extreme de putrefacţie intestinală, H_2S nu este absorbit în cantitate apreciabilă.

Oxidul de carbon se combină cu Hb în aceeaşi proporţie ca şi oxigenul, formînd un compus stabil, greu disociabil denumit carboxihemoglobina(HbCO). Aviditatea Hb pentru CO este de 200--250 ori mai mare decît pentru O_2 iar disocierea este de 300 ori mai lentă comparativ cu HbO_2. Prezenţa a 0,07% CO în aerul respirator, transformă 50% din Hb în HbCO, ceeace determină pericolul deosebit al acestui gaz.

Una din metodele folosite pentru evidenţierea Hb şi a derivaţilor ei, este analiza spectrală.

Principiu: pigmenţii sanguini au proprietatea de a absorbi anumite lungimi de undă din spectrul luminii, prezentînd benzi de absorbţie caracteristice, după care pot fi identificaţi (Fig.12)

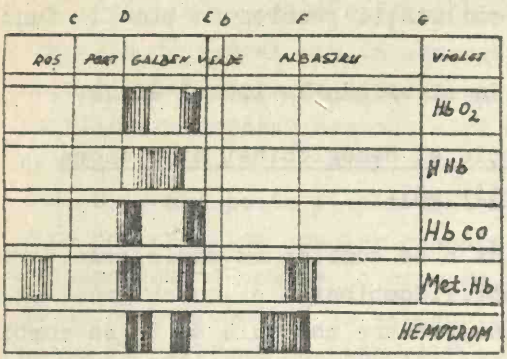


Fig.12Spectrul de absorbţie al hemoglobinei şi unor derivaţi ai ei.

Material necesar:sînge oxalatat sau hematii;spectroscop de mînă;fericianură de K 10%; NaOH 20%; gaz care să conţină CO; lichid Ville-Derrien(1 g SO_4Fe+ +2g acid tartric+20ml apă distilată+NH_4OH pînă la neutralizare).

Funcţionarea spectroscopului:Spectroscopul de mînă se compune dintr-un tub colimator de mînă,care la unul din capete are o deschidere îngustă pe unde intră lumina în aparat(de preferat lumina zilei). Razele luminoase vor străbate lentila celui de al 2-lea tub,numit lunetă,care alunecă în interiorul colimatorului.Razele care ies din lentilă sînt paralele şi vor atinge prisma sau sistemul de prisme ale lunetei,prin care vor suferi o descompunere.Astfel se obţine spectrul luminei, pe care observatorul îl vede în ocular.

Dacă între sursa de lumină şi fanta spectroscopului,introducem o soluţie diluată de sînge hemolizat, acesta va absorbi unele raze, iar în locul lor în spectru apar linii negre.

Spectroscopul se fixează pe un stativ cu fanta spre sursa de lumină, iar vasul pentru spectroscopie se aşează pe un suport chiar în faţa aparatului.

Tehnica:Oxihemoglobina(HbO_2): Se introduce în vasul spectroscopic o picătură de sînge sau hematii, se diluează cu 3-4ml apă distilată şi se amestecă după care se aşează în dreptul fantei, continuînd diluţia.Prin diluare la un moment dat apar vizibile 2 linii de absorbţie în zona galben şi verde (liniile D şi E ale lui Frauenhofer).Prin diluarea mai intensă a sîngelui, ele dispar.

Hemoglobina redusă(HHb).Pentru a avea o soluţie de hemoglobină,adăugăm la soluţia de mai sus,1 ml din lichidul Ville-Derrien, care are proprietăţi reducătoare(se poate folosi şi soluţia de sulfură de amoniu sau hiposulfit de sodiu).La spectroscop observăm o singură linie de absorbţie între liniile D şi E.Aceasta este banda lui Stockes caracteristică Hb.Dacă agităm eprube-

ta de cîteva ori,vor reapare benzile caracteristice HbO_2.

Methemoglobina:Soluţiei iniţiale de HbO_2 i se adaugă cîteva picături de fericianură de K 10% (oxidant).Se observă că în roşu apare o bandă întunecată, iar dacă soluţia este suficient de diluată se observă cele două benzi ale oxihemoglobinei(galben şi verde) şi chiar una în albastru.

Carboxihemoglobina:Se barbotează în soluţia iniţială de HbO_2, gaz de iluminat(timp de 10 minute), în care se găsesc şi urme de CO.Spectrul de absorbţie este acelaşi ca şi în cazul HbO_2, dar fiind o formă mult mai stabilă , nu o putem reduce cu soluţia Ville-Derrien ca în cazul HbO_2. CO se poate obţine şi prin acţiunea acidului sulfuric asupra acidului formic.

Hemocromogen: Se obţine din hemoglobină redusă tratată cu NaOH 20%.Prezintă un spectru de absorbţie în galben şi verde care persistă şi altul spre albastru, care dispare uşor.

c.Trasarea spectrului de absorbţie a unor pigmenţi respiratori.

Pigmenţii respiratori pot fi diferenţiaţi şi prin trasarea spectrului de absorbţie cu ajutorul spectrofotometrului Beckman.

Vom determina spectrul de absorbţie al oxihemocianinei,deoxihemocianinei(se obţine din oxihemocianină la care adăugăm cîţiva cristali de hidrosulfit de sodiu), clorocruorinei şi oxihemoglobinei.Soluţia de oxihemoglobină se obţine prin adăugarea a 2-3 picături de sînge luat din pulpa degetului, la 100 ml soluţie de amoniac(1 ml amoniac concentrat în 250 ml apă distilată).Are loc hemoliza eritrocitelor cu formarea unei soluţii limpezi de hemoglobină, care dă o extincţie de 50-60 la lungimea de undă de 550 nm.Clorocruorina se diluează pînă cînd obţinem o extincţie de aproximativ 50 la 600 nm.Hemolimfa obţinută din crab,obişnuit nu se diluează.

Procedeu:Se aranjează tamburul lungimilor de undă, la lungimile cele mai mici din spectrul vizibil.Ca martor folosim apa distilată, cu care aranjăm controlul luminei la 100.După aceasta punem în locul martorului proba de analizat,pornim mecanismul de înregistrare şi trasăm spectrul de absorbţie al pigmenţilor indicaţi mai sus.

BCU IASI / CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Întrebări de control:Care este capacitatea de oxigen a sîngelui total?Cum obţinem diferiţi derivaţi ai hemoglobinei şi care este spectrul lor de absorbţie?

8.PROPRIETATILE TAMPON ALE SERULUI SANGUIN.

La vertebratele superioare şi în deosebi la om sîngele se caracterizează printr-o stabilitate accentuată a reacţiei acido-bazice.Mărimea pH-ului oscilează în limite foarte restrînse(7,3--7,4),media fiind 7,36.Valoarea pH-ului sanguin se conservă cu toate că în sînge pătrund continuu produşi rezultaţi din procese metabolice, care tind să modifice reacţia mediului intern.La nivelul ţesuturilor se formează cu precădere produşi acizi(CO_2, acid lactic ,etc.).Este cunoscut că pentru a alcaliniza(reacţia la fenolftaleină) volume identice de plasmă şi apă, este necesar în cazul plasmei sanguine să adăugăm o cantitate de 40-70 ori mai mare de hidroxid de sodiu.Pentru acidifierea mediului(reacţia la metil orange),trebuie să adăugăm plasmei o cantitate de HCl de 300-400 ori mai mare, comparativ cu apa distilată.

Constanţa pH-ului sanguin se realizează prin intervenţia unui şir întreg de mecanisme reglatoare şi în primul rînd prin intermediul sistemelor tampon din sînge:1.acid carbonic-bicarbonat de Na(tampon carbonic); 2.fosfat mono-şi disodic(tampon fosfat); 3.hemoglobina(hemoglobina acidă/hemoglobinat de K); 4.proteinele plasmatice(tampon proteic).

Material necesar:ser sanguin diluat de 10 ori;NaOH 0,01N; HCl-0,1N;metilorange;fenolftaleină;biurete;pipete;pahare.

Tehnica:Se pun într-un pahar 5 ml ser diluat, iar în alt pahar-5 ml apă distilată.Se adaugă cîte o picătură de metil orange şi se titrează cu HCl 0,1N pînă la menţinerea culorii roşii.Se notează numărul de ml(sau picături) de HCl folosit în ambele cazuri.

In alte două pahare se adaugă 5 ml ser diluat şi respectiv 5 ml apă.Se pune o picatură de fenolftaleină şi se titrează cu NaOH 0,01N pînă la menţinerea timp de 1 minut a culorii uşor violete.Se notează numărul de ml NaOH folosit.

Se va calcula de cîte ori s-a adăugat mai mult HCl şi respectiv NaOH la serul nediluat comparativ cu apa,în vederea schimbării reacţiei respective.

Recomandări:De notat rezultatele obţinute şi de formulat sub forma de concluzii semnificaţia experienţei.

Intrebări de control: Care este principiul de acţiune al sistemelor tampon? Cum putem explica capacitatea mai mare a sîngelui de a neutraliza acizii comparativ cu bazele?

9. REZISTENTA GLOBULARA.

Prin rezistenţa globulară se înţelege rezistenţa pe care o opun eritrocitele acţiunii hemolizante a soluţiilor hipotonice. Eritrocitele prezintă la exterior o membrană semipermeabilă. In sîngele normal plasma şi eritrocitele se găsesc în echilibru osmotic. Procentul normal de săruri din plasma omului este de aproximativ 0,94. Dacă diluăm substanţele dizolvate în plasmă prin adăugarea apei, se produce un flux de apă spre interiorul globulului roşu (curent endosmotic), cu atît mai mare cu cît diluţia sărurilor din exterior este mai mare. In globul se dezvoltă o presiune osmotică, căreea membrana celulară este incapabilă să-i reziste. Celula se umflă, devine globuloasă, membrana se rupe şi hemoglobina este pusă în libertate. Acest proces se numeşte hemoliză sau lacare

Globulul roşu normal opune o rezistenţă acţiunii dezintegrante a soluţiilor hipotonice. Celulele normale pot fi suspendate într-o soluţie salină de 0,6% fără să fie hemolizate. Celula îşi măreşte volumul, fără a hemoliza. In stadiul imediat premergător hemolizei, volumul globului reprezintă cam 165% din normal.

Datorită vîrstei diferite, globulele roşii din acelaşi sînge posedă o rezistenţă osmotică diferită, faţă de soluţii hipotonice. De aceea în cursul determinării, se evidenţiază o rezistenţă minimă şi o rezistenţă maximă a globulelor. Valoarea rezistenţei minime este dată de concentraţia soluţiei hipotonice în care începe hemoliza primelor hematii, iar rezistenţa maximă este dată de concentraţia maximă a soluţiei hipotonice, în care hemoliza este totală.

Rezistenţa globulară se poate modifica în unele stări patologice, încît determinarea ei prezintă importanţă practică.

Material necesar: NaCl 7‰; eprubete de hemoliză; pipete; apă distilată.

Tehnica diluţiilor cu picătura: Principiu: se testează rezistenţa prin prepararea unei serii de soluţii în concentraţie descrescîndă. Se notează concentraţia unde începe hemoliza şi unde hemoliza este totală.

Cu aceeaşi pipetă Pasteur(sau pipetă obişnuită) se repartizează picăturile de apă sau de NaCl 0,7% într-o serie de 22 eprubete, realizîndu-se o scară de diluţie dela 0,68-0,26%,diferenţa dintre două eprubete succesive fiind de 0,02%(Tabel 2.).

Tabelul 2.

Tehnica diluţiilor cu picătura pentru determinarea rezistenţei globulare.

Nr.eprubetei.	1	2	3	4	5	6	7	8
Picături apă	1	2	3	4	5	6	7	8
Picături NaCl	34	33	32	31	30	29	28	27
Concentraţia %	0,68	0,66	0,64	0,62	0,60	0,58	0,56	0,54

Nr.eprubetei	9	10	11	12	13	14	15	16
Picături apă	9	10	11	12	13	14	15	16
Picături NaCl	26	25	24	23	22	21	20	19
Concentraţia %	0,52	0,50	0,48	0,46	0,44	0,42	0,40	0,38

Nr.eprubetei	17	18	19	20	21	22
Picături apă	17	18	19	20	21	22
Picături NaCl	18	17	16	15	14	13
Concentraţia %	0,36	0,34	0,32	0,30	0,28	0,26

Se recoltează sîngele din venă fără anticoagulant şi se repartizează imediat cu o pipetă Pasteur uscată,cîte o picătură sînge în fiecare eprubetă.Se agită uşor eprubeta pentru a omogeniza sîngele,după care se lasă la temperatura camerei timp de 30 minute apoi se centrifughează şi se fac citirile sau se lasă să sedimenteze timp de 3 ore,după care se citeşte.Citirea se poate face şi după 24 ore cu condiţia ca stativul să stea la $4^{o}C$.

Rezistenţa minimă este dată de concentraţia primei eprubete în care apare un supernatant roz iar rezistenţa maximă este dată de prima eprubetă,care nu prezintă sediment de eritrocite.

Valori normale la om:-hemoliza iniţială(minimă)=0,46-0,42; hemoliza totală(maximă)=0,38-0,34 NaCl%.Cînd hemoliza iniţială apare la concentraţii mai mari de NaCl,rezistenţa globulară este scăzută, iar cînd hemoliza iniţială apare la concentraţii mai mici, rezistenţa este crescută.

Tehnica diluţiilor cu pipeta gradată:In 21 eprubete se repartizează cîte 1 volum de licnide în felul următor:se aspiră de fiecare dată cîte 1 ml NaCl 1% din care 0,7ml punem în prima eprubetă iar restul de 0,3 ml-în ultima.La a doua pipetare se adaugă 0,68 ml în a doua eprubetă şi 0,32 în penultima şi aşa mai departe.La pipetarea apei distilate se procedează invers.

In felul acesta se realizează o scară cu o diluţie crescîndă între eprubetele succesive de 0,02%.In rest se procedează ca şi la tehnica cu picature.

Recomandări:se va nota rezistenţa minimă şi maximă a hematiilor.

Intrebări de control:Ce se înţelege prin rezistenţă globulară?Dece începem scara diluţiilor dela 0,68% şi nu dela 0,94% cît este concentraţia normală a sărurilor în plasmă?.

10.VITEZA DE SEDIMENTARE A HEMATIILOR.

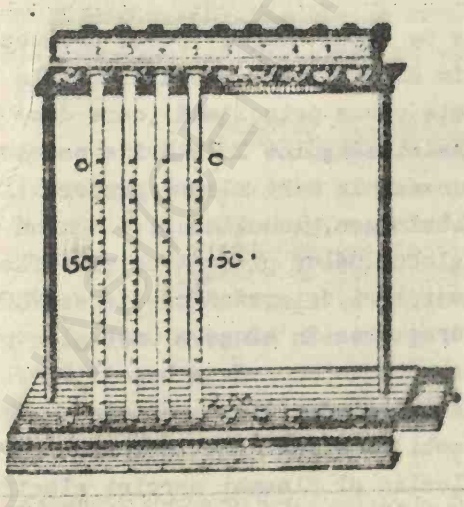
Sîngele este o suspensie de celule într-un lichid vîscos, plasma.Numai mişcarea permanentă a lichidului menţine răspîndirea uniformă a celulelor.Cînd circulaţia se opreşte, celulele încep să se depună.Dacă împiedicăm coagularea sîngelui, sedimentarea poate continua pînă cînd stratul superior de plasmă clară se separă de celulele care au căzut la fund.

Viteza de sedimentare a hematiilor(VSH sau VSE) este dată de numărul de mm de plasmă clară, care se formează după 1 sau 2 ore în partea superioară a unei coloane verticale de sînge.

Pentru determinarea VSH se foloseşte în mod obişnuit metoda Westergreen.

Material necesar:aparat Westergreen;citrat trisodic 3,8%; pipete;eprubete de hemoliză;seringă.

Aparatul Westergreen este format dintr-un suport de fixare a tuburilor şi din tuburi de sedimentare(Fig.13).Tuburile de sedimentare sînt lungi de aproximativ 30 cm şi perfect calibrate,diametrul interior este de 2,5-3mm.Pe tub sînt imprimate diviziunile la distanţă de cîte 1 mm, dela 0-200 mm.Diviziunea zero se găseşte situată către partea superioară a tubului.



Suportul prezintă în partea inferioară mici dopuri de cauciuc, iar în cea superioară cleme prevăzute cu arcuri.

Fig.13 Aparat Westergreen.

Tehnica:Cu o pipetă gradată de 1 ml,se pune într-o eprubetă de hemoliză (sau o capsulă) 0,4ml citrat de sodiu (folosirea oxalatului de sodiu,dă viteze mai mari).Se scoate prin punctie venoasă o cantiate de 2-3 ml sînge, care se pune într-o eprubetă uscată.Se aspiră imediat 1,6 ml sînge şi se adaugă în eprubeta cu anticoagulant.Se amestecă prin înclinări lente de cîteva ori.Se aspiră sîngele în pipeta Westergreen pînă la diviziunea zero,după care se astupă cu arătătorul partea de sus, pentru a se opri pe loc coloana de sînge.Vîrful pipetei se aplică pe dopul de cauciuc dela partea inferioară a stativului, iar capătul superior al pipetei se fixează în partea de sus a stativului.Pipeta trebuie să fie în poziţie perfect verticală.In tuburi înclinate viteza este mai mare.Determinarea se face la temperatura de 20°C.Citirea se face la 1 şi 2 ore.Determinarea - VSH trebuie să se facă imediat după recoltare sau cel tîrziu după 2-3 ore.Conservarea sîngelui micşorează viteza.

Valori normale:bărbat- 1-10mm/1 h; 7-15mm/2h.

femeie-2-13mm/1h ; 12-17mm/2h.

Interpretarea rezultatelor:Teoretic viteza de sedimentare a eritrocitelor ar putea depinde atît de factorii plasmatici cît şi de cei globulari.Astfel greutatea specifică a plasmei în raport cu cea a globulelor ar putea constitui un factor care să ducă la modificarea VSH-ului.

O diminuare a vîscozităţii plasmei sau o mărire a volumului globulului,ar putea determina o creştere a vitezei de sedimentare.

Aglomerarea unor celule de volum normal, poate produce acelaşi efect ca şi creşterea în dimensiune a fiecărei celule în parte.Acest ultim factor, este cauza principală ,care duce la scăderea stabilităţii suspensiei sanguine în stările patologice. Agregarea globulelor se datorează în mare măsură proporţiilor relative ale fracţiunilor fibrinogen,globulină şi albumină din plasmă.Astfel predominanţa globulinelor plasmatice şi a fibrinogenului,care au molecule mai mari,determină creşterea VSH. Acelaşi efect determină şi creşterea în sînge a unei glicoproteine(aglomerină),ce se adsoarbe la suprafaţa hematiilor.

In cazul scăderii vitezei de sedimentare, se adsorb la suprafaţa hematiilor în deosebi albuminele,cu moleculă mai mică, care le conferă în mediul alcalin al plasmei sarcini electrice negative.

Cu toate că constituţia proteică a plasmei este de obicei singurul factor important care influenţează VSH-ul, mulţi alţi factori pot exercita o oarecare influenţă asupra ei, ca de exemplu: temperatura: creşterea temperaturii peste 20° accelerează VSH şi invers; raportul lecitină/colesterol al plasmei, viteza fiind întîrziată prin creşterea concentraţiei de lecitină şi accelerată de colesterol; concentraţia globulelor roşii-creşterea numărului de nematii întîrzie VSH-ul, iar scăderea o accelerează. De aceea fiziologic bărbatul are o VSE mai redusă.

Întrebări de control: Ce se înţelege prin VSH? Care este mecanismul de influenţare a factorilor plasmatici asupra VSH?

II. COAGULAREA SÎNGELUI.

Coagularea sîngelui intră în cadrul celor mai importante reacţii de apărare ale organismului. Ea se rezumă la un lanţ de reacţii enzimatice, în care participă un număr de proteine plasmatice. În timpul coagulării, fibrinogenul solubil din plasmă, se transformă în fibrină insolubilă sub forma unei reţele, ce cuprinde în ochiurile sale elementele figurate ale sîngelui, iniţiind astfel formarea cheagului, care duce la oprirea hemoragiei.

Explorarea funcţională a coagulării, se face prin teste globale, prin teste care explorează fazele coagulării (de ex: pentru profază timpul de protrombină a lui Quick; timpul de trombină) şi în sfîrşit, teste care urmăresc evidenţierea insuficienţei unui anume factor al coagulării (dozarea sa biochimică sau imunochimică). În cele ce urmează vom face cunoştinţă cu cîteva procedee folosite pentru explorarea funcţiei de coagulare a sîngelui.

Studiul coagulării globale.

Studiul coagulării globale se face prin următoarele probe:

1. Timpul de coagulare
2. Timpul de recalcificare (Howell)
3. Metoda de coagulare-diluţie
4. Toleranţa la heparină.

Aceste teste nu precizează faza coagulării, factorul care determină deficienţa, sau natura deficienţei în coagulare. Din aceste teste, toleranţa la heparină este testul cel mai sensibil.

BCU SIBIU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

1.Timpul de coagulare.

Prin timp de coagulare se înţelege timpul scurs din momentul scoaterii sîngelui din vas şi pînă la coagularea lui.

Tehnica în cameră umedă.

După dezinfectarea pulpei degetului, se face o înţepătură destul de profundă,cu un ac de seringă flambat în prealabil.O picătură de sînge se aşează pe o lamă uscată şi curată,care a fost pusă într-o placă Petri cu hîrtie de filtru la bază(pentru a creia o cameră umedă).Se notează momentul introducerii picăturii de sînge.La fiecare 30 secunde se înclină lama.Se consideră timpul de coagulare,timpul scurs din momentul aplicării picăturii şi pînă cînd această picătură nu se mai deformează.

Valori normale=4-5 minute.

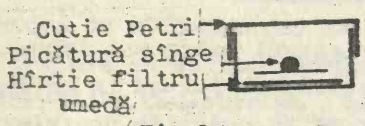


Fig.14.Coagularea sîngelui în camera umedă.

Metoda Lee şi White.

Se efectuează rapid priza de sînge(prin venepuncţie) pentru a se evita acţiunea trombokinazei tisulare, care poate modifica valorile finale.Se repartizează într-o eprubetă 1 ml sînge şi se pune la baie la 37°C.Procesul coagulării se consideră început din momentul aspirării sîngelui cu seringa,cînd se dă drumul cronometrului.La fiecare minut se înclină eprubeta cu 45°.Coagularea s-a produs cînd la înclinare,sîngele nu mai curge din eprubetă.Se citeşte timpul scurs.

Valori normale=6-12 minute

2.Timpul de recalcifiere(Howell).

Reactivi:oxalat de Na-1,34%; Cl_2Ca- M/10.

Sîngele se recoltează pe anticoagulant,oxalat de Na, (1:10;v/v;anticoagulant/sînge).Se centrifughează concomitent cu proba martor normal timp de 5 minute la 1500 ture/minut.

Tehnica:Se pune într-o eprubetă o,2ml Cl_2Ca M/10, pornindu-se din acest moment cronometrul.Citirile se fac prin înclinarea eprubetei scoase uşor din apă, la intervale de 15 sec. pînă la 1 minut,apoi din 10 în 10 secunde.Coagularea este terminată cînd amestecul se coagulează sub forma unui cheag compact,opa-

lescent sau ,uneori, sub forma unor filamente dense de fibrină. In acest moment se opreşte cronometru.

Valori normale:1'10''-2'10".

3.Toleranţa la heparină „in vitro".

Principiu:se studiază timpul de recalcificare a plasmei oxalatate în prezenţa unor cantităţi de heparină.

Material necesar:plasmă oxalatată de cercetat; plasmă normală martor oxalatată;Cl_2Ca M/40; heparină,baie la 37°C.

Sîngele se recoltează pe oxalat de Na.După centrifugarea concomitentă a probelor cu martorul,se face analiza.Martorul normal se recoltează dela un sex masculin,deoarece la femeie apar modificări ale coagulabilităţii în timpul ciclului menstrual.

Tehnica:Se fac diluţii de heparină în soluţia de Cl_2Ca M/40. Heparina folosită din comerţ, conţine 5000 U/ml.

Tubul 0=0,5ml soluţie Cl_2Ca M/40
Tubul 1=0,5ml soluţie Cl_2Ca M/40 conţinînd 0,3U heparină
Tubul 2=0,5 ml soluţie Cl_2Ca conţinînd 0,7 U heparină
Tubul 3=0,5ml soluţie Cl_2Ca ce conţine 1U heparină.

Se ţin cele patru tuburi în baie la 37°.

In fiecare tub se adaugă cîte 0,5ml plasmă de cercetat,începînd cu tubul 3.Se dă drumul la cronometru,atunci cînd se adaugă plasmă în tubul 0.Tubul 0 se citeşte din 10 în 10 secunde, iar tuburile 1-3 se citesc din minut în minut.Citirea se face prin înclinarea uşoară a tubului la 45°.Se consideră coagularea terminată,atunci cînd prin răsturmarea tubului,nu curge nici o serozitate.

Rezultate normale:Tubul 0 trebuie să dea un timp de recalcificare sub 2 minute 30 secunde.Dacă se obţine un timp mai mare testul nu are valoare, fie că plasma a fost mult centrifugată şi este săracă în trombocite, sau condiţiile de recoltare şi de recalcificare sînt greşite.Tubul 3=10-12 minute;tubul 2=6-8 minute; tubul 1=4-5 minute.

Studiul hemostazei legate de vas.

Acest studiu se urmăreşte prin următoarele teste: 1:timp de sîngerare;2:Rezistenţa capilară; 3:retracţia chiagului; 4:studiul trombocitului.

1.Timp de sîngerare:Tehnica Duke.

Determinarea timpului de sîngerare se face pur şi simplu înţepînd pielea şi notînd timpul de care are nevoie picătura de sînge pentru a se coagula şi a astupa astfel orificiul din piele, oprind sîngerarea.

Metoda de lucru:cu ajutorul acului Francke se face o înţepătură în lobul urechii de 2 mm adîncime şi 2 mm lungime;fixarea se face cu un dop de cauciuc sau cu o lamă plasate în spatele lobului urechii.Picăturile de sînge, care se scurg,sînt absorbite pe o fîşie de hîrtie de filtru la fiecare 30 secunde. Se va avea grijă ca hîrtia de filtru să vină numai în contact cu picătura de sînge.Sfîrşitul sîngerării este considerat momentul cînd hîrtia de filtru nu se mai colorează.

Valori normale: 2-4 minute.Un timp peste 5 minute este totdeauna patologic.Practicat corect el reflectă funcţia hemostatică a vaselor şi a trombocitelor.In hemofilie timpul de sîngerare este normal.

2.Rezistenţa capilară(Proba Rumpell-Leede).

Principiu:crearea unei staze venoase favorizează trecerea eritrocitelor prin endoteliul capilar în ţesut.

Se utilizează diferite procedee.Mai comod, se comprimă braţul cu manşeta aparatului de tensiune, menţinînd acul între presiunea maximă şi minimă(10-20mm sub presiunea sistolică) timp de 10 minute.Se măsoară timpul de apariţie a primelor peteşii sau numărul de peteşii vizibile cu lupa sau ochi neînarmat în primele 5-6 minute.La indivizii normali apar uneori peteşii, 5-8 la număr,dar după 5-6 minute.In cazuri patologice, numărul este foarte mare şi apar înainte de 5 minute.

Interpretare:-puţine peteşii la marginea inferioară a manşetei=slab pozitiv+

-număr moderat de peteşii în plica cotului=pozitiv+.

-peteşii pînă la treimea superioară a antebraţului=pozitiv++

-peteşii pînă la articulaţia pumnului=pozitiv +++

-peteşii pe faţa dorsală a mîinii=pozitiv ++++.

Rezistenţa capilară este scăzută în avitaminoza C şi P, hepatici,hipertensivi,uremici,diabetici.

Timpul de protrombină Quick.

Principiu:In prezenţa unui exces de tromboplastină tisulară şi a Cl_2Ca, plasma normală se coagulează într-un timp foarte scurt,de 10 secunde,ocolind prima fază a coagulării.

Reactivi:Oxalat de Na 1,34%;tromboplastină;Cl_2Ga M/40.

Se prepară tromboplastina calcică,amestecînd în părţi egale soluţia de tromboplastină cu clorura de calciu M/40.

Tehnica:Se recoltează sîngele de cercetat pe oxalat de Na (9 volume sînge/1 volum anticoagulant).Se centrifughează la 1500 ture/minut/5 minute.Se recoltează şi sînge martor,normal şi se prelucrează identic.

Toţi reactivii şi plasma decantată se ţin la baie la 37°C.

Intr-o eprubetă ţinută la baie se introduc:

-plasmă....0,1ml
-tromboplastină calcică...0,2ml.Se cronometrează timpul din momentul adăugării tromboplastinei.Se face o primă citire la 5 secunde,o a doua la 10 secunde,prin scoaterea rapidă a eprubetei din apă şi înclinînd-o în aşa fel încît conţinutul să se prelingă uşor pe peretele sticlei.După a 2-a citire, se repetă citirile la intervale de 2 secunde şi se opreşte cronometrul în momentul apariţiei cheagului.Valoarea standard pentru ziua respectivă se determină cu o plasmă normală.

Valori fiziologice:10-18 secunde.

Timpul de protrombină Quick nu reflectă numai modificările protrombinei, ci şi variaţiile tuturor factorilor complexului protrombinei.In hipoprotrombinemii,hipoconvertinemii,hipoacclerinemii,şi în scăderile factorului Stuart, timpul de protrombină Quick este prelungit.

Recomandări:se vor nota valorile obţinute.

Intrebări de control:Care este interpretarea actuală a mecanismului coagulării sîngelui? Care este sensul biologic al procesului de coagulare? Enumeraţi cîteva substanţe şi metode folosite pentru inhibarea sau activarea coagulării.

BCU IAŞI CENTRU UNIVERSITAR LIBRARY

12.DETERMINAREA GRUPELOR SANGUINE.

Pe baza lucrărilor lui Lansteiner şi colaboratori, sîngele diferitelor persoane poate fi clasificat în patru grupe principale, denumite O,A,B,AB.La început aceste grupe au foat desemnate în aceeaşi ordine cu cifre romane I,II,III şi IV(după Janski).

Baza acestei clasificări constă în natura antigenica a eritrocitelor şi a anticorpilor din ser.Antigenii,denumiţi obişnuit aglutinogeni, au fost desemnaţi cu majuscule:A şi B, iar anticorpii, numiţi aglutinine,au fost desemnaţi anti-A sau α şi respectiv anti-B sau β .Funcţie de prezenţa sau absenţa aglutinogenelor pe hematii şi a aglutininelor în ser,rezultă apartenenţa sîngelui la grupa respectivă.Unele caracteristici ale grupei sînt redate în schema de mai jos:

Grupa	Aglutinogen prezent în hematii	Aglutinina prezentă în ser	Frecvenţa grupei la europeni	Transfuzii: Primeşte dela grupa	Donează grupei
I O α,β	-	α,β	45%	O	O,A,B,AB.
II A β	A	β	42%	O,A	A,AB.
IIIB α	B	α	10%	O,B	B,AB
IV ABo	AB	-	3%	O,A,B,AB;	AB

Determinarea grupei sanguine se face pe baza reacţiei de aglutinare a hematiilor, care apare ori de cîte ori A se întîlneşte cu α şi B se întîlneşte cu β .Natura acestei reacţii este similară cu aceia dintre un antigen şi anticorpul corespunzător. In vederea stabilirii grupei sanguine,se fac două probe obligatorii:1-Determinarea aglutinogenelor;2-determinarea aglutininelor.

1.Determinarea aglutinogenelor.

Material necesar:seruri hemotest grupa O,A,B.;lame de microscop,;seringi;material de dezinfectat pulpa degetului.

Tehnica:Pe o lamă de microscop se pun succesiv cu seringi diferite,cîte o picătură mare de ser hemotest din grupa O,A,B, in ordinea indicată în Fig.15.Cu un colţ de lamă se ia din pulpa degetului o cantitate de sînge cam de 10 ori mai mică decît picătura de ser hemotest şi se amestecă bine.Picăturile de sînge pentru celelalte seruri hemotest,se iau cu colţuri diferite ale lamei(pentru a nu amesteca serurile între ele).

Citirea se face după 2-5 minute cu ochiul liber, sau cel mult o lupă,punînd lama pe un fond alb şi împrimîndu-i o uşoară

mişcare de rotaţie.In cazul aglutinării,hematiile se ingrămădesc apărînd pe fondul clar al lichidului, ca grăunţele de piper (Fig.15a).Dacă aglutinarea nu se produce,lichidul rămîne uniform roz.Dacă hematiile nu aglutinează cu nici unul din serurile hemotest, sîngele aparţine grupei zero.Reacţia hematiilor,aparţinînd celorlalte grupe,este indicată în Fig.15a.

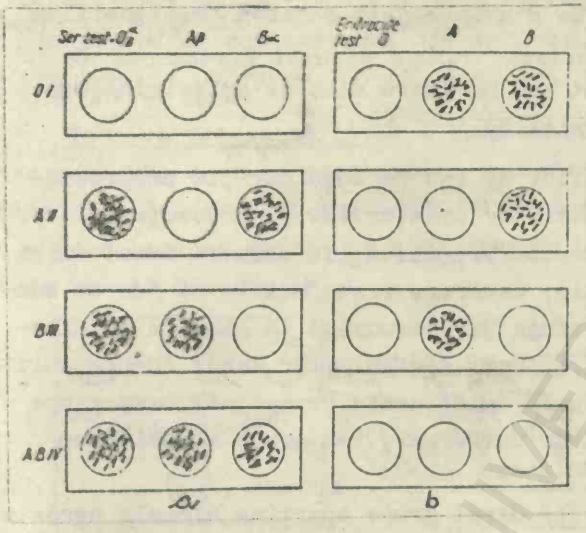


Fig.15.Determinarea grupelor sanguine clasice.a-determinarea aglutinogenelor;b-determinarea aglutininelor.

Determinarea aglutininelor(Proba Simonin)

Se face punînd în contact serul de cercetat cu eritrocitele cunoscute din grupa O, A,B.

Metoda de lucru:se pun pe lamă 3 picături din serul de cercetat şi se adaugă peste fiecare cîte o picătură de 10 ori mai mică de suspensie de eritrocite O,A,B în plasma lor proprie.Se aşteaptă 2-5 minute după care se citeşte.Grupa $O_{\alpha\beta}$=aglutinare cu aglutinogenele A şi B, prin prezenţa în serul de cercetat a aglutininelor α şi β.Lipsa de aglutinare în prima picătură cu eritrocitele O,aglutinarea obţinută fiind specifică(martor negativ).

Grupa A_β=aglutinare cu eritrocite B;Grupa B_α=aglutinare cu eritrocite A;grupa ABo=se constată lipsa totală de aglutinare (Fig.15b).

False reacţii pozitive:

a.Determinarea la temperaturi scăzute(sub 15°C).

b.serul-test sau eritrocitele-test infectate;apare panaglutinarea(aglutinare în toate trei picăturile)

c.prezenţa de globuline în exces(VSH crescut,boli infecţioase,femei în perioada menstruală).

d.pseudoaglutinare.Fenomenul dispare prin adăugarea de ser fiziologic.

False reacţii negative:

a.serul hemotest are titrul slab prin depăşirea perioadei de valabilitate.

b.utilizarea unei suspensii prea concentrate de eritrocite, fără efect aglutinant vizibil.

c.citirea înainte de 2 minute dela punerea amestecurilor în contact.

d.serul de analizat are un titru slab de aglutinine,cum este cazul vîrstnicilor.

In cazul transfuziilor se iau în consideraţie proprietăţile antigenice ale hematiilor donatorului şi prezenţa anticorpilor din serul primitorului.Proprietăţile serului donatorului nu se iau în consideraţie, deoarece transfuziile se fac cu cantităţi relativ mici de sînge şi pătrunzînd în sîngele primitorului,datorită diluţiei,titrul aglutininelor scade foarte mult, pierzînd proprietăţile sale aglutinante.Pe această bază grupa O este considerată donator universal, iar grupa AB-primitor universal.

Intrebări de control: Cărei grupe aparţine sîngele cercetat de voi?Căror grupe sanguine poate fi transfuzat acest sînge? De la ce donator poate primi sînge această grupă sanguină?Dacă sîngele grupei zero poate fi transfuzat grupei ABo, de ce nu putem face şi invers(adică sîngele grupei AB să fie transfuzat grupei O)?.

13.DETERMINAREA FACTORULUI Rho(D).

Factorul(aglutinogenul) Rh a fost descoperit de Landsteiner şi Wiener 1940.El este prezent în sîngele a 83-86% din indivizii de rasă albă,numiţi din această cauză Rh pozitivi(Rh+). Restul de 14-17% -sînt numiţi Rh negativi(Rh-).In sîngele indivizilor Rh-, apare aglutinina anti-Rh după o transfuzie cu sînge Rh+,iar la femei,în plus,imunizarea poate avea loc cu sîngele unui făt Rh+.Transfuzarea hematiilor Rh+ unui receptor imunizat anterior poate cauza o reacţie fatală, globulele transfuzate suferind aglutinarea şi hemoliza.

Astăzi se cunosc mai mulţi antigeni Rh.Primul antigen cunoscut este denumit D sau Rho iar anticorpul său se numeşte anti-D.Antigenul D este cel mai puternic.

Material necesar:ser anti-Rho(D);eritrocite cunoscute Rh+ şi Rh- în suspensie în serul propriu,sîngele fiind colectat

fără anticoagulant;cutie Petri cu hîrtie umezită,servind drept cameră umedă; lame;pipete Pasteur;termostat la 37°C.

Sîngele de cercetat se recoltează din pulpa degetului;cu ajutorul unei pipete Pasteur se pune într-un tub de hemoliză o cantitate de 0,5-1ml sînge.După ce se coagulează, se sparge cheagul cu vîrful pipetei Pasteur,obţinîndu-se eritrocitele necesare suspendate în ser propriu.

Se procedează identic pentru recoltarea eritrocitelor cunoscute Rh+ şi Rh-.

Tehnica determinării:Pe o lamă se pune o picătură mare de ser anti-Rh, care se amestecă cu o picătură din suspensia de eritrocite de cercetat.Amestecul se face cu colţul unei lame.Pe o a doua lamă se repetă aceeaşi operaţie cu eritrocitele cunoscute Rh+ şi Rh-(Fig.16).

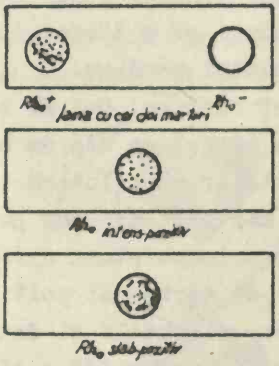


Fig.16.Determinarea factorului Rh pe lamă.

Lamele sînt aşezate în cutia Petri pe 2 baghete de sticlă.Pe fundul cutiei Petri se află o hîrtie de filtru umezită cu apă,pentru a creia o cameră umedă.Se pune la termostat la 37°C şi se citeşte după 1-2 ore.

Interpretarea rezultatelor:Dacă sîngele este aglutinat,sîngele este Rh+.In picăturile de control, eritrocitele Rh+ sînt aglutinate iar cele Rh- nu.Reacţia este considerată negativă numai după 2 ore la 37°C.

Recomandări: De notat rezultatul obţinut şi de conchis,în caz de nevoie ce fel de sînge poate fi transfuzat.

Intrebări de control:In ce condiţii poate apare boala hemolitică a nou-născutului? In ce cazuri de transfuzii a unui sînge Rh+ poate apare la receptor şocul de hemotransfuzie?

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

CAPITOLUL II.

FIZIOLOGIA INIMII.

Muşchiul cardiac posedă o serie de proprietăţi funcţionale, din care cele mai importante sînt automatismul, excitabilitatea, conductibilitatea şi contractilitatea.

Automatismul cardiac se află în pemanenţă sub controlul nervos şi umoral, care asigură adaptabilitatea travaliului cardiac la condiţiile variate ale mediului intern şi extern.

In timpul activităţii cardiace apar o serie de fenomene fizice, denumite manifestări externe ale activităţii cardiace. Dintre acestea, mai importante pentru studiul stării funcţionale a sistemului cardio-vascular, sînt următoarele: 1- tonusul cardiac; 2- mişcările mecanice ale inimii în timpul ciclului cardiac; 3- deplasarea sîngelui prin cavităţile inimii şi a sistemului vascular; 4- activitatea bioelectrică a muşchiului cardiac.

Proprietăţile de bază ale muşchiului cardiac, pot fi studiate atît pe inima de broască sau reptile, cît şi pe cea de mamifer. In general se preferă inima vertebratelor poikiloterme, deoarece inima de mamifer necesită condiţii mai pretenţioase pentru menţinerea activităţii sale (aport de oxigen, temperatura apropiată de cea a corpului, presiune etc). Inima de vertebrat poikiloterm este mai rezistentă manipulărilor experimentale şi datorită vitezei mai reduse ale proceselor biochimice, putînd rezista o perioadă mai îndelungată în afara corpului. Multe din proprietăţile de bază ale inimii, au fost descoperite iniţial pe inima de broască sau broască ţestoasă, care ulterior s-au dovedit a fi aplicabile şi pentru inima mamiferelor.

14. INREGISTRAREA CONTRACTIILOR INIMII DE BROASCA.

Activitatea inimii se compune din sistole şi diastole periodice ale diferitelor regiuni. Succesiunea modificărilor care au loc în inimă şi repetarea lor în timpul fiecărei contracţii, constituie ciclul cardiac. La o frecvenţă cardiacă de 70 contracţii pe minut, durata lui este de 0,85 secunde, din care pentru sistola atrială revine aproximativ 0,1 secunde, iar pentru cea ventriculară - 0,3 secunde. Cardiografia, adică înregistrarea grafică a ciclurilor cardiace, constituie unul din procedeele folosite la poikiloterme pentru studiul activităţii mecanice a

inimii.

Material necesar:Kimograf;peniţă Engelmann;cronograf;instrumentar de disecţie;broaşte.

Tehnica:Broasca se imobilizează prin distrugerea măduvei spinării(vz.anexa).După aceasta se aşează pe pluta de disecţie cu faţa ventrală în sus, se fixează cu bolduri şi se trece la descoperirea inimii.

Se face o incizie mediană a tegumentului deasupra sternului.Se ridică cu o pensă xifisternul cartilaginos şi se face cîte o incizie de fiecare parte a cartilagiului.Prin zona deschisă se introduce o lamă a foarfecelui cît mai anterior,ţinînd-o cît mai aproape de os şi se secţionează muşchii şi centura extremităţilor anterioare pe ambele părţi iar în cele din urmă peretele anterior al toracelui.Se obţine un lambou triunghiular cu vîrful în jos(Fig.17).Ne apare inima învelită în pericard, care se secţionează în direcţia axului longitudinal al inimii şi se înlătură.După aceasta se leagă frenul cardiac.In acest scop, se ridică ventriculul, se introduce o aţă pe sub frenul cardiac şi se leagă.Sub nodul făcut,se secţionează frenul. Cu ajutorul acestui fir de aţă putem ridica inima şi inspecta suprafaţa ei posterioară(Fig.17,1-4).Se observă contracţia iniţială a sinusului, urmată de auricule, ventricul şi în cele din urmă,bulbul.

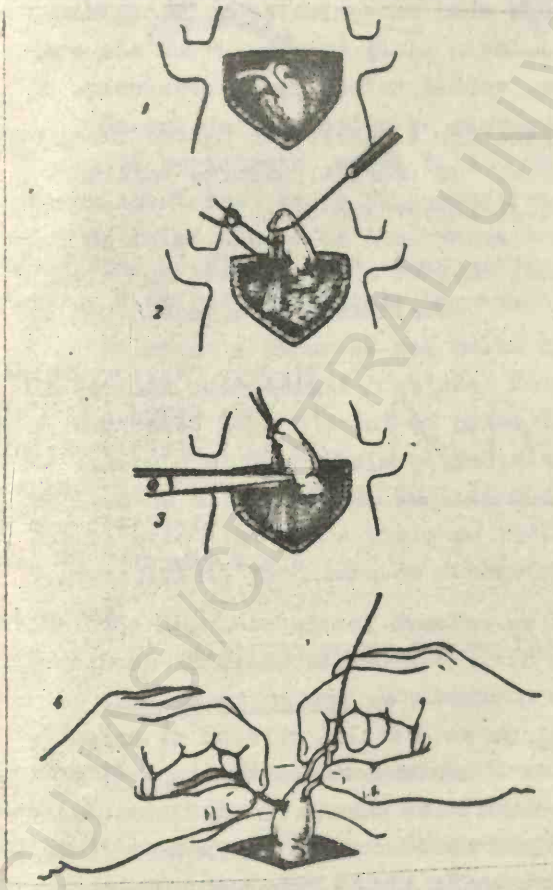


Fig.17.Pregătirea inimii de broască.

Se face o instalaţie ca în Fig.18.In momentul diastolei se prinde vîrful ventriculului cu un serfin

şi se face legătura cu peniţa Engelmann,care funcţionează ca o pîrghie de gradul I.Capătul înscriitor al peniţei se pune în legătură cu cilindrul kimografului sub un unghi de 15°.Se montează de desubt cronograful şi se pune în mişcare kimograful.Din timp în timp se umectează inima cu soluţie fiziologica.

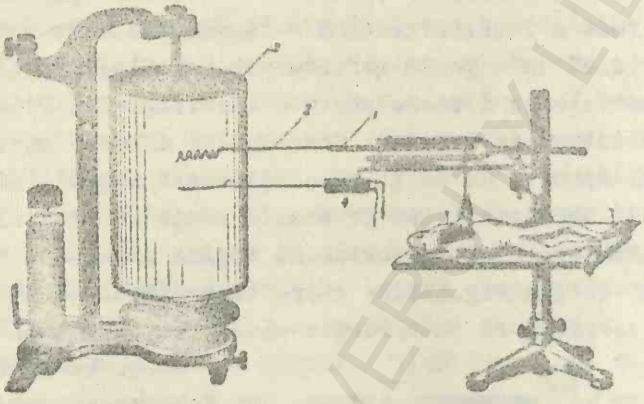


Fig.18.Schema de instalare a aparatelor pentru înregistrarea cardiogramei de broască.1-peniţa Engelmann; 3-kimograf;4-cronograf electric.

Se înregistrează o cardiogramă ca în Fig.19 în care toate deflexiunile ascendente corespund sistolelor, iar cele descendente-diastolelor.

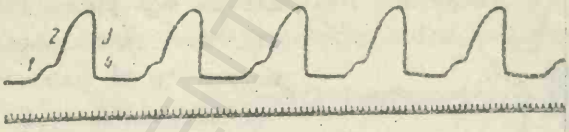


Fig.19. Cardiograma normală de broască.1-sistola auriculară;2-sistola ventriculară;3-diastola ventriculară;4-pauza generală.Timpul=0,05 sec.

Pe graficul obţinut se notează fazele ciclului cardiac,după care se fixează.Se va determina durata ciclului cardiac cît şi durate fiecărei faze în parte.

Intrebări de control.Ce este ciclul cardiac şi care sînt fazele componente? Care este ordinea de contracţie a diferitelor părţi cardiace? Cum se va modifica durata fazelor ciclului cardiac la o frecvenţă cardiacă de 40 contracţii pe minut?Cum îşi modifică culoarea ventriculul în timpul contracţiei?

BCU IAŞI CENTRALA UNIVERSITARĂ LIBRARY

15.AUTOMATISMUL INIMII DE BROASCA.LIGATURILE LUI H.STANNIUS.

O inimă menţinută in vitro în condiţii fiziologice,deşi izolată de influenţele nervoase şi umorale extrinseci, îşi continuă activitatea sa ritmică.Această proprietate poartă denumirea de automatism cardiac.Natura automatismului cardiac este miogenă,fiind generat de excitaţiile ritmice , care apar în anumite zone ale ţesutului muscular cardiac, care şi-a păstrat unele caractere embrionare.In totalitatea sa, acest ţesut muscular alcătuieşte ceeace se numeşte sistemul excito-conductor al inimii.La mamifere acest sistem este reprezentat de nodulul sino-atrial(Keith-Flack),nodulul atrio-ventricular(Aschoff-Tawara), fasciculul Hiss şi reţeaua lui Purkinje.

La vertebrate poikiloterme el este localizat în zona sinusului la limita lui cu auriculul în apropierea ganglionului Remak(ganglion parasimpatic unde sinapseazâ fibrele preganglionare ale nervului vag) şi la nivelul pîlniei atrio-ventriculare în apropierea ganglionului Bidder(ganglion parasimpatic).

Gradul de automatism al sistemului excito-conductor la inima de vertebrate, scade cu cît ne depărtăm de zona sinusului venos.Acest fapt poate fi demonstrat prin secţionarea porţiunilor de inimă,urmată de observarea comportării ei,sau prin ligaturile lui Stannius,prin care se izolează mecanic(fără a se secţiona) diferite zone cardiace.

Stannius a raportat mai multe ligaturi,din care au intrat în ştiinţă doar trei:1-ligatura întîia la limita dintre sinus şi auricule; 2-la o inimă cu prima ligatură, se aplică o a doua la limita dintre auricule şi ventricul şi 3-ligatura a treia,care se face pe o inimă nouă, la limita dintre auricule şi ventricul. Uneori prin ligatura a treia se izolează o porţiune din vîrful ventriculului, prin care se demonstrează că el nu posedă automatism.

A.Demonstrarea automatismului inimii.

Echipament necesar:cronometru;instrumentar de disecţie; broaşte.

Tehnica:se secţionează ţesuturile şi vasele în jurul sinusului venos şi se aşează inima într-o sticlă cu soluţie Ringer pentru broască.De notat că inima îşi continuă ritmul de contracţie pe care l-a avut in situ.Dacă inima se află în condiţii bune, se poate observa o uşoară accelerare a frecvenţei.

B.Ligaturile lui Stannius.

Tehnica:se prepară inima de broască ca şi în lucrarea 15. Observăm anatomia inimii(Fig.20).

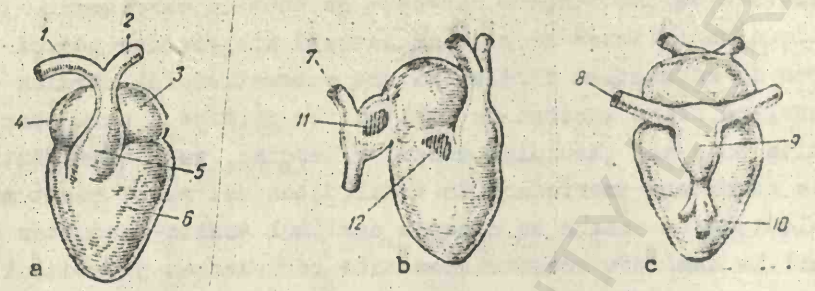


Fig. 20 Schema anatomică a inimii de broască.
a-vedere de pe faţa ventrală;b-vedere din profil;c-vedere de pe faţa dorsală;Ramul stîng(1) şi drept(2) al trunchiului arterial; auriculul stîng(3) şi drept(4);5-bulb cardiac;6-ventricul;vena cavă superioară dreaptă(7) şi stîngă(8);9-sinus venos;10-vena cavă posterioară;11-ganglionul Remak;12-ganglionul Bidder.

Se determină frecvenţa cardiacă normală.Cu ajutorul unei pense, se introduce un fir de aţă pe sub bifurcaţia trunchiului arterial, se ridică inima în sus şi se aplică prima ligatură la limita dintre sinus şi auricule(Fig.21a,b).Dacă ligatura este corect aplicată, auriculele şi ventriculul după 1-2 contracţii, se opresc în diastolă, iar sinusul continuă ritmul de contracţie avut anterior.După un interval de 5 minute pînă la o oră şi jumătate,inima reîncepe să bată, iniţial auriculele apoi ventriculul,dar într-un ritm mult mai lent comparativ cu sinusul.

Indată după aplicarea primei ligaturi, dacă inima continuă să rămînă în repaos , se aplică cea de a doua ligatură la limita dintre auricule şi ventricul(Fig.21 b,c),care va excita mecanic ţesutul excito-conductor din această zonă.Ventriculul îşi va începe contracţia ritmică,cu un ritm mult mai lent(ritm idioventricular), în timp ce auriculele rămîn staţionare.

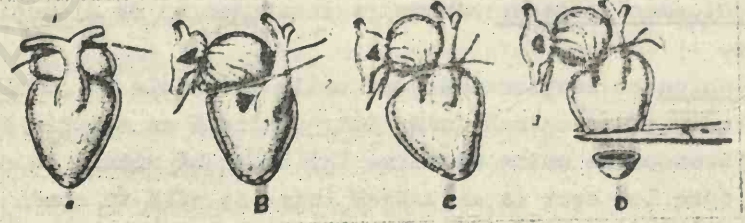


Fig.21.Izolarea inimii cu ajutorul ligaturilor Stannius.

Cea de a treia ligatură se aplică pe o inimă nouă, la limita dintre auricule şi ventricul, cînd se observă mai bine ritmul idioventricular de contracţie al ventriculului, în timp ce auriculele se contractă în acelaşi ritm cu sinusul venos.

Dacă secţionăm treimea posterioară a ventriculului(Fig.21d, apexul izolat nu se contractă niciodată .Dacă-l excităm mecanic,el răspunde prin contracţii unice la fiecare excitant.Dacă introducem un cristal de ClNa în apexul izolat, el începe să se contracte ritmic.

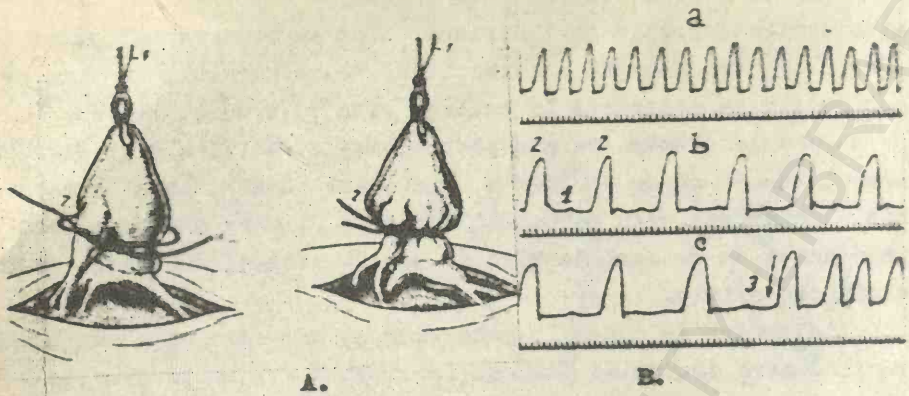
Intrebări de control: Unde apar şi cum se răspîndesc impulsurile, care determină contracţia ritmică a inimii?.Care este gradul de automatism al diferitelor sectoare cardiace?.

16. BLOCUL CARDIAC SI STIMULAREA ELECTRICA A INIMII.

Blocul cardiac apare în urma afectării conducerii excitaţiei dela nivelul sinusului cardiac spre zonele inferioare ale inimii,ceeace se exteriorizează prin contracţii asincrone ale auriculelor şi ventriculelor;ventriculele avînd o contracţie mult mai lentă.Astfel de afecţiuni pot fi observate în practica medicală,datorită afectării sistemului excito-conductor al inimii.In ultimul timp, pentru tratarea acestor afecţiuni, se utilizează electrocardiostimulatori(ECS)-dispozitive ce generează impulsuri electrice de o anumită frecvenţă.Electrozii ECS se implantează în ventricule,prin intermediul cărora se transmit impulsuri electrice cu o frecvenţă sincronă cu aceea a contracţiei sinusului.In felul acesta se normalizează frecvenţa de contracţie a auriculelor cu ventriculele.

Material necesar:kimograf; peniţa Engelmann;stimulator.

Tehnica:Se prepară inima de broască ca în cazul înregistrării cardiogramei.Se aplică serfinul pe vîrful ventriculului(Fig.22) de care este ataşat un electrod al electrocardiostimulatorului. Electrodul celălalt al ECS se aplică pe piciorul broaştei.După ce se înregistrează o porţiune de cardiogramă normală, se aplică o ligatură între auricule şi ventricul(Fig.22A).De exemplu înregistrează cîteva contracţii(Fig.22B,b).Determinăm frecvenţa de contracţie a auriculelor.Aranjăm frecvenţa ECS, ca să coincidă cu cea a auriculelor.Se înregistrează cîteva contracţii în urma cardiostimulării(Fig.22B,c).Intensitatea curentului trebuie să fie de prag.



A. B.

Fig.22.A.Aplicarea ligaturii pentru obţinerea unui bloc artificial al inimii.1-electrod ce leagă serfinul de stimulator. 2-ligatura.B.Cardiograma broaştei.a-normală;b-după bloc cardiac (1-contracţia auriculelor;2-contracţia ventriculelor);c-revenirea la normal a frecvenţei cardiace după stimulare(săgeata). Timpul=0,05 secunde.

Intrebări de control:Ce este blocul cardiac? Care trebuie să fie frecvenţa stimulatorului pentru a obţine în cazul blocului cardiac o normalizare a frecvenţei cardiace?.

17. PARTICULARITATILE FUNCTIONALE ALE MUSCHIULUI CARDIAC

A. Legea „tot sau nimic".

Această lege a fost formulată de Bowditch(1871), care a observat că stimularea inimii,cu intensităţi de curent peste valoarea de prag, provoacă totdeauna contracţii maxime.Deci spre deosebire de musculatura scheletică(Vz. capitolul muşchi) contracţia muşchiului cardiac, este independentă de intensitatea excitantului.In realitate excitarea electrică nu activează procesul de contracţie, ci pune în joc procesul de excitaţie, care propagîndu-se prin miocard,se manifestă maximal.Deci această lege este valabilă pentru generalizarea procesului de excitaţie în miocard şi nu pentru forţa de contracţie a inimii,care are un caracter adaptativ, fiind influenţată de factori ionici, metabolici,endocrini,etc.

Echipament necesar:Kimograf;peniţa Engelmann;bobină de inducţie;întrerupător;acumulator.

Tehnica:se aplică o ligatură la nivelul dintre sinusul venos şi auricule.Cu ajutorul unui serfin,legăm vîrful ventriculului de peniţa înscriitoare . Se aplică doi electrozi, care

să atingă uşor suprafaţa ventriculului în repaos.Electrozii sînt în legătură cu bobina secundară a bobinei de inducţie.Se face un circuit ca în Fig.23.Peniţa înscriitoare vine în contact cu kimograful staţionar.Prin apropierea sau depărtarea bobinei secundare de primar,se află o intensitate de curent puternică,care dă o contacţie a ventriculului.După fiecare contracţie înregistrată, deplasăm cu mîna cilindrul kimografului.După 15-20 secunde dela prima contracţie se excită ventriculul cu un curent mai slab(prin depărtarea bobinelor între ele).Se continuă scăderea curentului, pînă cînd inima nu mai răspunde.De notat că inima ori nu se contractă de loc, sau dă contracţii maximale. Se va compara cu modul de comportare a muşchilor scheletici.

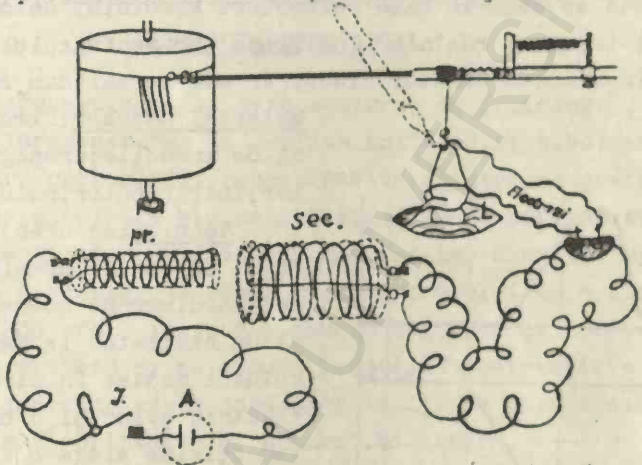


Fig. 23.Metoda aplicării excitantului unic al ventriculului.L=ligatura;A=acumulator;I=întrerupător;bobina primară (Pr.) şi secundară(sec.) a bobinei de inducţie.

Intrebări de control: In locul primei ligaturi a lui Stannius,cum s-ar putea modifica metoda pentru demonstrarea acestei legi?.

B.Particularităţile excitabilităţii cardiace şi extrasistola.

In timpul contracţiei, muşchiul cardiac suferă modificări fazice ale excitabilităţii.In Fig.24 sînt redate schematic fazele excitabilităţii.Imediat după începerea excitaţiei(1), muşchiul cardiac pierde complet excitabilitatea sa(faza refractară absolută).După această fază,excitabilitatea se reface treptat,rămînînd totuşi sub valoarea normală-faza refractară rela-

tivă(2).Urmează o fază a excitabilităţii crescute(3),care este de scurtă durată, după care excitabilitatea revine la nivelul de plecare(4).Datorită duratei relativ mari a fazei refractare relative,muşchiul cardiac nu intră în contracţie tetanică,caracteristică modului de contracţie a muşchilor scheletici.

Dacă se excită muşchiul cardiac în perioada fazei refractare relative,el răspunde printr-o contracţie,numită extrasistolă sau contracţie prematură.După extrasistola ventriculară, are loc o alungire a diastolei ventriculare-pauza compensatoare. Mecanismul pauzei compensatoare este următor:impulsul generat la nivelul nodulului sinusal ajunge în ventricul în momentul cînd acesta se află în faza refractară absolută, datorită extrasistolei; impulsul rămînînd ineficace iar ventriculul aşteaptă sosirea impulsului următor plecat în mod normal,din zona sinusului.

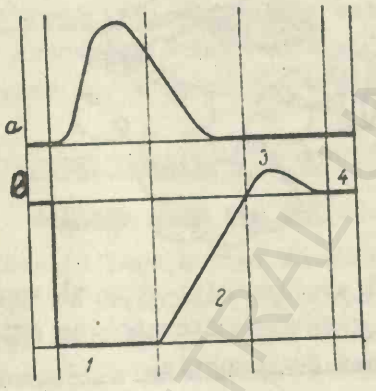


Fig.24.Modificări fazice ale excitabilităţii cardiace. a-contracţia unică;b-modificarea excitabilităţii.

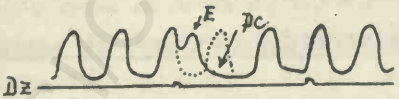


Fig.25.Extrasistola(E) şi pauza compensatoare(p.c.).Dz= momentul aplicării excitantului.

Material necesar:Kimograf;bobină de inducţie;cronograf;excitator;întrerupător;soluţie Ringer.

Tehnica:se aranjează inima ca şi în cazul înregistrării unei cardiograme normale.Se aplică un excitator la baza ventriculului montat în circuitul electric avînd şi o bobină de inducţie.Se alege o tensiune optimă a curentului de excitare.Se înregistrează concomitent şi timpul cît şi momentul aplicării excitantului(cu ajutorul semnalului electromagnetic)(Fig. 25).Se înregistrează o porţiune de cardiogramă normală, după care se aplică cîte un excitant în următoarele faze ale contracţiei ventriculare:la mijlocul contracţiei muşchiului;în perioada contracţiei de vîrf;în perioada relaxării şi în diastolă.

Perioada refractară şi pauza compensatoare pot fi studiate şi pe o inimă în repaos,indus de prima ligatură a lui Stannius. În acest caz inima trebuie să fie excitată cu un curent indus,

iar excitanţii următori se aplică la intervale tot mai scurte. Cînd excitantul devine ineficace, el cade în faza refractară.

Recomandări:se va desena schema experienţei.De notat pe cardiogramă extrasistola şi pauza compensatoare.

Intrebări de control:Ce este faza refractară absolută şi relativă? Ce importanţă prezintă aceste faze pentru activitatea inimii?.Ce este extrasistola şi pauza compensatoare? Cît de mare este intervalul dintre ciclul cu extrasistola şi ciclul cardiac următor?.

18.MANIFESTARI ALE ACTIVITATII INIMII.

ELECTROCARDIOGRAFIA.

Electrocardiografia este sectorul de fiziologie, care se ocupă cu înregistrarea şi analiza activităţii electrice a inimii. Electrocardiograma(ECG) reprezintă înregistrarea grafică a manifestărilor electrice ale activităţii cardiace.Fiind expresia depolarizării şi repolarizării membranelor fibrelor miocardice, ca urmare a genezei şi răspîndirii procesului de excitaţie în miocard, ECG oferă indicaţii asupra naşterii şi conducerii excitaţiei în miocard şi nu asupra forţei de contracţie a inimii. Deci ECG caracterizează două proprietăţi de bază ale muşchiului cardiac:excitabilitatea şi conductibilitatea.

Colectarea potenţialelor electrice ale inimii se poate face direct de pe inimă, aplicînd un electrod de colectare la baza inimii(în zona sinusului), iar cel de al doilea-pe vîrful ei.

Fiind înconjurată de electroliţi şi ţesuturi, care sînt buni conducători de electricitate,cîmpul electric generat de inimă poate fi colectat şi indirect-de pe diferite părţii ale suprafeţei corpului.Cele mai răspîndite sînt următoarele conduceri(sau derivaţii):1-conducerile standard(clasice sau indirecte);2-conducerile precordiale(semidirecte) şi 3-conduceri unipolare ale membrelor.

In conducerile standard, diferenţa de potenţial înregistrată cu electrocardiograf între mîna dreaptă şi mîna stîngă alcătuieşte conducerea(derivaţia) I; între mîna dreaptă şi piciorul stîng =conducerea II; între mîna stîngă şi piciorul stîng=conducerea III (Fig.26).Pentru modul de aranjare a electrozilor de

colectare în celelalte tipuri de conduceri,vezi Santa şi Jitariu pagina 401.

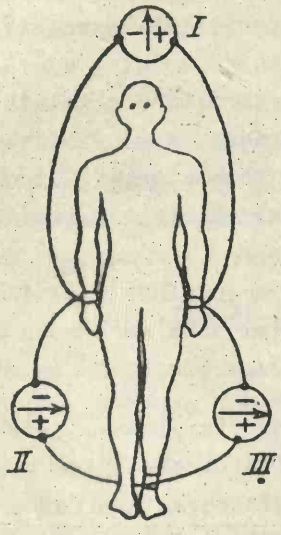


Fig.26.Aranjarea electrozilor în cele trei derivaţii standard.

Echipament necesar:Electrocardiograf; electrozi;cuşcă Faraday;tifon;NaCl 5-10%.

Tehnica:Electrocardiograful folosit în acest scop, funcţionează pe principiul unui oscilograf catodic, adaptat special pentru înregistrarea activitaţii electrice a inimii.Sensibilitatea aparatului trebuie să fie de ordinul milivolţilor şi să răspundă la o frecvenţă de 50-100 c/secundă.Ne fiind sensibil la frecvenţe mai mari,el va discrimina potenţialele produse de musculatura scheletică, care ar putea interfera în observarea ECG.

Electrocardiograful are posibilitatea de a colecta succesiv diferenţele de potenţial de pe cele trei derivaţii prin mutarea comutatorului pe derivaţia respectivă.Se face legătura aparatului cu pămîntul.Se încălzeşte aparatul cîteva minute, se alege o intensitate luminoasă a spotului de electroni, care să lase o remanenţă adecvată şi apoi focalizăm spotul.Amplificarea aparatului se aranjează în aşa fel încît lmv să dea o deflexiune de 1 cm.

După pregătirea aparatului se pregăteşte pacientul.Electrozii metalici se aplică pe cele 3 extremităţi indicate, peste un tifon sau vată îmbibată în NaCl 5-10% şi uşor stoarsă.Aceasta asigură un contact mai bun al electrozilor cu corpul omului. Se aranjează pacientul în decubit cu faţa în sus(pe un pat cu plasă metalică sau cuşcă Faraday în vederea izolării cîmpului electromagnetic extern), se ataşează conductorii dintre electrozi şi aparat: firul roşu se pune pe electrodul de pe mîna dreaptă; firul galben-la mîna stînga iar firul verde-la piciorul stîng.Comutatorul conducerilor standard se pune pe derivaţia I şi apoi pe celelalte două.După o scurtă perioadă de stabilizare a baleierii fasciculului de electroni,se reduce la nevoie sectorul cu ajutorul compensatorului I şi II,se aranjează o viteză adecvată de baleiere (cu butonul velocity) şi se obser-

vă ECG.Cînd trecem dela osciloscopie la înregistrare, se pune cardiograful pe înregistrare şi se dă drumul dispozitivului mecanic de fotografiere a ECG.

Caracterizarea ECG normale.

Electrocardiograma se prezintă sub forma unei curbe,caracterizate prin trei deflexiuni pozitive(undele P,R,T) şi două negative(undele Q şi S)(Fig.27);segmente(intervalul dintre sfîrşitul unei unde şi începutul alteia) şi intervale(care constă dintr-o undă şi un segment).

Unda P este dată de depolarizarea atriilor.Se caracterizează printr-o amplitudine de 0,2-0,3mv şi o durată de 0,06-0,12 secunde(media 0,08 secunde).Ea precede cu 0,02 secunde sistola atrială.Este separată de complexul QRS printr-o linie izoelectrică, numită segment P-R,care reprezintă timpul cînd atriile şi-au terminat depolarizarea.Lungimea acestui segment este dată şi de timpul necesar prelucrării undei de excitaţie de către nodulul Aschoff-Tawara,fasciculul Hiss şi reţeaua Purkinje, pe care o răspîndeşte în miocardul subendocardic ventricular.

Intervalul P-R măsoară 0,16-0,2 secunde.Prelungirea acestei durate indică o tulburare de conducere atrio-ventriculară.

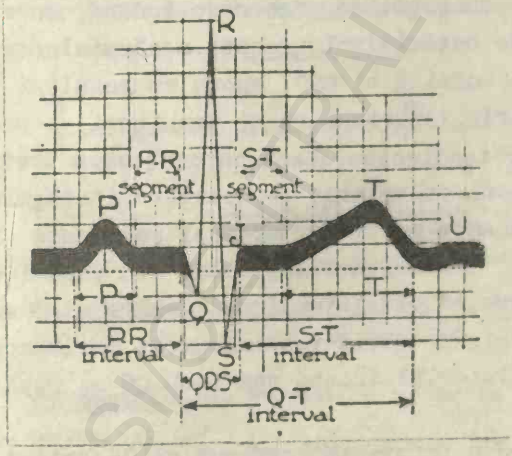


Fig.27.Caracteristicile electrocardiogramei normale.

Complexul QRS este dat de depolarizarea masei musculare ventriculare.Durata: 0,06-0,1s.Amplitudinea nu depăşeşte 2,5mv(în conducerea II) şi nu scade sub 0,5 mv în conducerea III.

Intervalul Q-T cuprins între începutul undei Q şi sfîrşitul undei T, este de 0,26-0,45 s.El reprezintă sistola electrică.

Segmentul S-T apare cînd depolarizarea cuprinde toată masa ventriculară şi dispar diferenţele de potenţial, din care cauză apare sub forma unei linii izoelectrice.Uneori pot apare supra- sau subdenivelări, care au semnificaţii funcţionale.

Unda T este dată de repolarizarea ventriculului.Amplitudi-

nea ei este de aproximativ 0,3mv,variind foarte mult.Durata-aproximativ 0,16 secunde.Ea coincide cu faza de ejecţie maximă Spre sfîrşitul ei se produce cel de al 2-lea zgomot cardiac. Zgomotul I, apare imediat după vîrful undei R.Depolarizarea auriculelor generează unda Ta, care nu apare pe ECG, fiind mascată de complexul QRS.

Intervalul T-P corespunde diastolei.

Amplitudinea deflexiunilor în cele trei conduceri standard, diferă.Valorile maxime se obţin în conducerea II,deoarece această conducere coincide mai bine cu axa electrică a inimii.

Unda U este o deflexiune uşoară,pozitivă, care urmează undei T.Se găseşte în aproximativ 60% din ECG normale.S-a sugerat că ea ar reprezenta un post-potenţial pozitiv.

Forma undelor, succesiunea lor, durata intervalelor şi a segmentelor, constituie indici utilizaţi de cardiologi pentru stabilirea diferitelor afecţiuni.

Intrebări de control: Ce proprietăţi ale muşchiului cardiac exprimă ECG?.Care este mecanismul genezei undelor, intervalelor şi a segmentelor de pe ECG?.Care este frecvenţa cardiacă în cazul cînd intervalul dintre două unde R succesive, este de 0,75s?.

19.FONOCARDIOGRAFIA.

Activitatea inimii este însoţită de fenomene sonore, care constau din două zgomote de bază.Primul zgomot, a cărui început coincide aproape cu vîrful undei R al ECG, apare ca rezultat al: 1-închiderii valvulelor atrio-ventriculare şi tensiunii exercitate asupra lor şi corzilor tendinoase, odată cu creşterea presiunei intraventriculare (elementul valvular); 2-proiectării sîngelui din ventricul şi şocul transmis pereţilor arterei pulmonare şi aortei(elementul vascular); 3-tensiunii muşchilor din ventricul.

Zgomotul al doilea rezultă din:1-închiderea valvulelor semilunare; 2-deschiderea valvulelor atrio-ventriculare; 3-vibrarea vaselor mari şi a ventriculelor.El începe cam la 0,09 s. după vîrful undei T al ECG.

La omul sănătos, avînd o frecvenţă cardiacă de 75/ minut, primul zgomot durează 0,11 secunde;prima pauză-0,2 secunde; al doilea zgomot durează 0,07 secunde, iar pauza a doua-0,42 s.

Studiul zgomotelor cardiace prezintă importanţă în stabilirea diagnosticului bolilor cardiace.Importanţă mare prezintă

intervalul dintre începutul ECG complexului ventricular(undaR) şi apariţia primului zgomot(în condiţii normale este egal cu 0,06 s.) din care cauză înregistrarea fonocardiogramei se face concomitent cu ECG.

Echipament necesar:fonocardiograf;microfon special;electrocardiograf.

Fonocardiograful transformă fenomenele acustice ce apar în inimă, în oscilaţii electrice, ce pot fi înregistrate pe electrocardiograf sau banda de magnetofon.Microfonul este o modificare a microfonului obişnuit, care poate fi fixat pe cuşca toracică.

Tehnica:pentru înregistrarea concomitentă a fono- şi electrocardiogramei pe un electrocardiograf cu două canale, se uneşte electrocardiograful cu fonocardiograful.Unul din electrozii pectorali este introdus în locaşul I al fonocardiografului;electrodul de pe mîna stîngă a pacientului-în locaşul II, iar locaşul III este folosit pentru împămîntare.Electrodul de culoare roşie se pune pe mîna dreaptă,iar electrodul cu fir verde-pe piciorul stîng.Electrodul de împămîntare se pune pe piciorul drept.Canalul al 2-lea al electrocardiografului, se pune pe derivaţia a II-a.

Se fixează microfonul cu un leucoplast pe zona toracică supracordială dorită.Inregistrarea concomitentă a ECG şi fonocardiograma este redată în Fig.28.

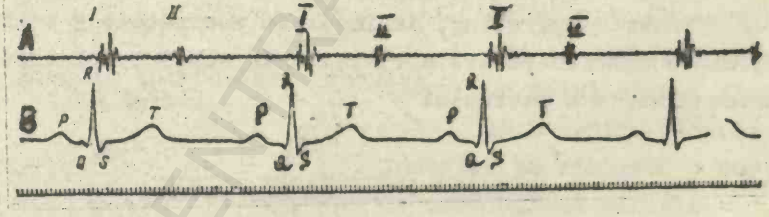


Fig.28.Fonocardiograma(A) şi electrocardiograma(B) la om.Timpul-0,02 secunde.

Recomandări:se va indica zgomotul I şi II,durata lor cît şi a pauzelor.

Intrebări:care sînt avantajele fonocardiografiei comparativ cu auscultaţia obişnuită a inimii?.Care este mecanismul formării primului şi celui de al doilea zgomot cardiac?.

20.AUSCULTATIA ZGOMOTELOR CARDIACE.

La ascultarea inimii direct cu urechea sau cu ajutorul fonendoscopului sau stetoscopului, se aud două zgomote, care se deosebesc prin înălţime şi durată.Primul zgomot este surd şi mai prelungit, iar cel de al 2-lea-scurt şi ascuţit.Ambele zgomote se ascultă pe toată întinderea cutiei toracice, corespunzătoare regiunii inimii, însă cel mai bine-la locul de proiecţie al valvulelor(Fig.29.)

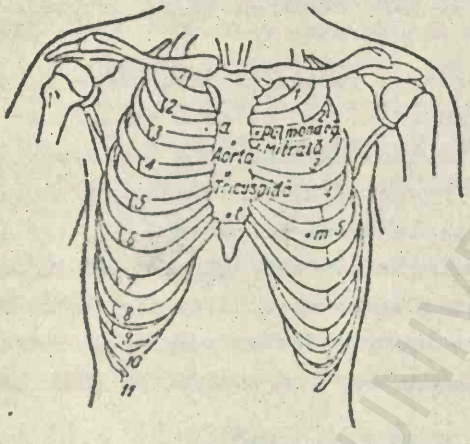


Fig.29.Proiecţia valvulelor cardiace şi locul de ascultare a zgomotelor cardiace.

Locul de proiecţie al valvulei bicuspide(mitrale) se află mai jos de fixarea celui de al treilea cartilaj costal stîng de stern, iar locul de optimă ascultare-în al cincilea spaţiu intercostal la 1-1,5 cm înăuntrul liniei medioclaviculare.

Ascultarea valvulei tricuspide se face la capătul inferior al corpului sternului, de partea dreaptă.Valvulele sigmoide ale arterei pulmonare se ascultă în spaţiul 2 intercostal stîng, în imediata vecinătate a sternului iar valvulele semilunare ale aortei-tot în spaţiul 2 intercostal,pe partea dreaptă a sternului

REGLAREA ACTIVITATII INIMII.

21.PERFUZIA INIMII DE BROASCA SI INFLUENTA UNOR ELECTROLITI SI HORMONI ASUPRA ACTIVITATII INIMII.

Inima de broască izolată de corp, continuă să bată un timp, după care moare treptat.Pusă în aceleaşi condiţii experimentale, inima de mamifer îşi încetează activitatea mult mai rapid(1-2 minute).In ambele cazuri cauza morţii constă în lipsa de oxigen şi a unui mediu salin adecvat.Perfuzînd inima cu un lichid oxigenat şi izoosmotic cu sîngele,capacitatea ei vitală va fi mult prelungită.Ringer a arătat că pentru supravieţuirea unei inimi izolate, prezintă importanţă nu numai condiţiile osmotice

ale lichidului de perfuzie ci şi natura sărurilor folosite pentru prepararea soluţiei de perfuzie,respectînd enumite raporturi dintre ionii suluţiei.

Material necesar:kimograf;peniţă Engelmann;canule de perfuzie;soluţiile indicate mai jos;instrumentar de disecţie.

Tehnica:Se descoperă inima de broască prin procedeul cunoscut şi se curăţă vena cavă inferioară.Introducem un fir de aţă pe sub venă, cu un foarfece de iris secţionăm în formă de v peretele vasului, prin care introducem canula plină cu soluţie Ringer(Fig.30).Legăm vasul în jurul canulei şi ridicînd uşor canula, secţionăm ţesuturile şi vasele din jurul inimii.In felul acesta scoatem inima fixată de canulă din corp.Trebuie avută grijă ca în momentul introducerii canulei, să nu distrugem zona sinusului venos(de ce?)şi să nu pătrundă în inimă bule de aer.

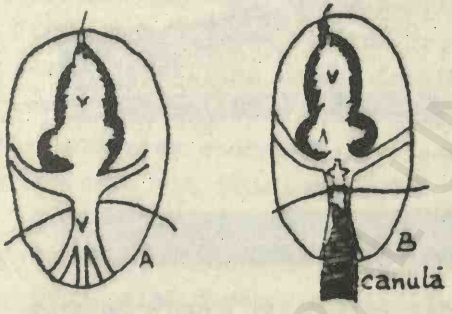


Fig.30.Etapele introducerii canulei în inimă.

Atîrnăm inima pe un suport şi o conectăm la ansamblul de perfuzie(Fig 31).Trebuie să avem grijă de a păstra constant nivelul lichidului din canula de perfuzie.Cu un serfin prindem vîrful ventriculului pe care-l legăm de peniţa Engelmann. În felul acesta sîntem gata pentru experienţă. Inscriem pe kimograf o porţiune de cardiogramă normală.

Experienţa clasică a lui Sydney Ringer(1880-1886).Perfuzăm inima cu următoarele soluţii-una după alta-pînă la obţinerea rezultatelor stabile:a).soluţie Ringer;b).ionul de Ca în exces preparat din amestecarea a 99 ml soluţie Ringer cu 1 ml CaCl 10%;c).soluţie Ringer; d). ionul de K în exces preparat din 99ml soluţie Ringer+1 ml

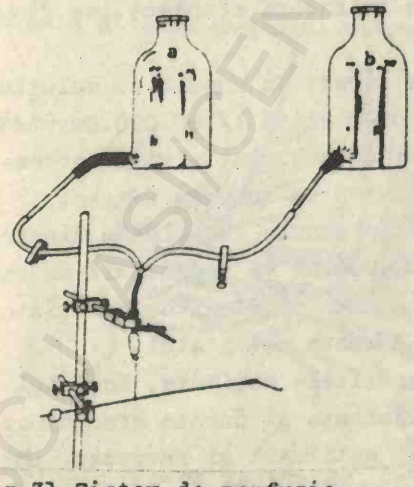


Fig.31.Sistem de perfuzie.

KCl 10%;e)-soluţie Ringer;f)-soluţie NaCl 0,6%;g)-soluţie Ringer; h)-acid în exces preparat din soluţie Ringer+HCl N/400 pînă la pH 4;i)-soluţie Ringer;j)-soluţie Ringer la pH aproximativ 9 ajustat cu NaOH N/400.Ce rost are repetarea soluţiei Ringer?.

Unele din efecte ce se obţin(cît şi denumirea lor), sînt redate în Fig.32

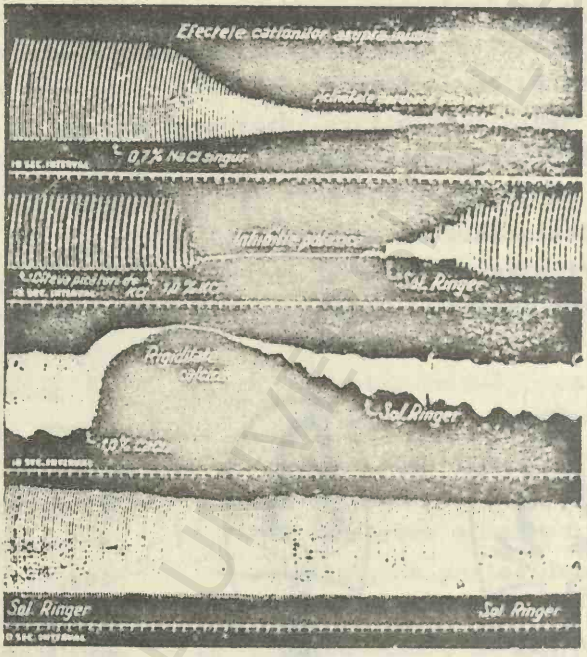


Fig.32.Efectele cationilor asupra inimii.

După adăugarea mediului acid, contracţiile devin tot mai mici, în cele din urmă inima se opreşte în diastolă.După adăugarea mediului alcalin,inima nu se relaxează complect iar final se opreşte în sistolă.

Efectul adrenalinei:se adaugă direct în canulă cu soluţia Ringer,0,5ml soluţie adrenalină hidroclorică 1/100.000.De observat accelerarea şi creşterea forţei de contracţie(efect cronotrop şi inotrop pozitiv).Se spală inima cu soluţia Ringer.

Efectul acetilcolinei:adăugăm în canula cu soluţie Ringer, 0,5 ml acetilcolină diluată 1/1.000.000.Se va repeta ultima experienţă după adăugarea în canulă a unei picături de soluţie de sulfat de atropină 1% şi se va comenta rezultatul.

Recomandări:se va indica pe graficele obţinute, momentul aplicării unei substanţe studiate,latenţa şi durata efectului.

Intrebări:Ce excitanţi umorali activează şi respectiv in-

hibă activitatea inimii?

REGLAREA NERVOASA A ACTIVITATII INIMII.

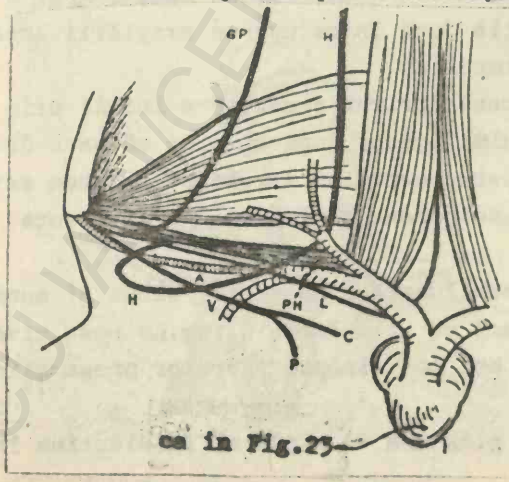
22.Nervii vagi.

Nervii vagi sînt cardioinhibitori.Prin stimularea lor se observă o rărire a frecvenţei cardiace(efect cronotrop negativ), slăbirea forţei de contracţie(efect inotrop negativ),scăderea tonusului(efect tonotrop negativ) şi o diminuare a conductibilităţii(efect dromotrop negativ).In privinţa excitabilităţii muşchiului cardiac,excitarea vagului induce o scădere a cronaxiei(indice al creşterii excitabilităţii) în schimb intensitatea de prag este mărită(indice al scăderii excitabilităţii).

Nodulul sino-atrial este inervat mai ales de vagul drept, iar nodulul atrio-ventricular primeşte majoritatea fibrelor parasimpatice din vagul stîng.Nervii vagi drept şi stîng, au efecte diferite:excitarea vagului drept provoacă o rărire şi o slăbire a contracţiilor inimii în timp ce vagul stîng provoacă o rărire a contracţiilor ventriculare sau o oprire a ventriculelor prin deprimarea conducerii atrio-ventriculare şi blocarea impulsurilor care vin dela atrii.

Echipament necesar:Kimograf;peniţa Engelmann; cronograf; instrumentar de disecţie;soluţie Ringer;acumulator,excitator.

Tehnica:se descoperă inima ,se înlătură pericardul şi se leagă frenul după care trecem la descoperirea nervului vag.Pentru aceasta se secţionează muşchii şi fasciile între unghiul maxilarului şi inima.Pe această cale se pătrunde în regiunea axilară pînă la muşchiul petro-hioid(Fig.33).



ca în Fig.23

Fig.33.Traiectul şi relaţiile trunchiului vago-simpatic la broască. V=n.vag;P=ram pulmonar; C=ram cardiac;L=ram laringeal;H=hipoglosul; GP=glosofaringianul; A=artera carotidă;PH= muşchi petro-hioid.

Acest mușchi se inseră la baza craniului și pe cornul posterior al osului hioid.Se continuă incizia ceva mai anterior.Pe acest mușchi este localizat pachetul vasculo-nervos compus din artera carotidă,vena jugulară,nervul laringeal și vago-simpatic.

Două trunchiuri nervoase, care sînt dispuse anterior, se văd foarte clar: nervul hipoglos, care încrucișează pachetul vasculo-nervos și glosofaringianul.In spatele lor trece nervul vag și laringeal.

Trunchiul vago-simpatic este degajat de țesuturile înconjurătoare;se secționează nervii, care n-au legătură directă cu inima , iar sub pachetul vasculo-nervos se introduce o baghetă de sticlă, care ne va ajuta la introducerea pachetului pe excitator.Se recomandă a se introduce sub excitator o hîrtie parafinată în vederea izolării țesuturilor din jur.La broască nervul vag descoperit la acest nivel, conține și fibre ortosimpatice,încît stimularea lui poate cauza un efect dublu, efectul vagului se observă primul.Efectul simpaticului în general apare după întreruperea excitării.

Se prinde vîrful ventriculului de peniță Engelmann.Se înregistrează pe kimograf cu viteză redusă.Concomitent înregistrăm și timpul.Excitarea vagului se face cu un curent tetanizant,indus de o bobină de inducție(deblocam întrerupătorul Wagner din circuitul primar al bobinei de inducție),timp de aproximativ 3 sec.

-a:se excită de cîteva ori n. vag și se observă efectul produs asupra inimii(scăderea tonusului și a forței de contracție,rărirea bătăilor sau chiar oprirea inimii în diastolă);

-b:de notat dacă se observă o accelerare a bătăilor și o mărire a forței de contracție după întreruperea excitării.Aceasta este efectul fibrelor simpatice.

-c:uneori cînd se provoacă oprirea completă a inimii prin excitarea vagului, ventriculul începe după un timp să bată din nou, deși se continuă excitarea nervului vag.Acest fenomen este cunoscut sub denumirea de „scăparea inimii" de sub influența vagului.Cui se datorește?.

-d:se va excita linia semilunară albă dintre sinus și auricule.Se produce același efect cu stimularea n.vag.La cest nivel pătrunde în inimă n.vag și are loc sinapsa fibrelor preganglionare.

-e:aplicăm pe inimă o picătură de nicotină 7%.Nicotina în

doza indicată, blochează sinapsa la nivelul staţiei celulare, după care excitarea vagului,rămîne ineficace.Dacă excităm linia albă semilunară,se reproduce efectul vagului,deoarece excitantul va acţiona în acest caz asupra fibrelor postganglionare dincolo de zona blocată.

-f:se va aplica o picătură de atropină 0,5%.Atropina blochează terminaţia nervoasă a fibrei postganglionare, încît excitarea liniei semilunare, va fi ineficace.

Recomandări:pe graficele obţinute se va marca felul experienţei.Se va determina frecvenţa cardiacă după excitarea n.vag.

Intrebări de control:Care sînt efectele n. vag asupra activităţii cardiace?.

23.Acţiunea vagului asupra inimii de pisică.

Echipament necesar:electrocardiograf;stimulator;instrumentar chirurgical; uretan 20%;pisică.

Tehnica:se anesteziază cu uretan(i.p.400mg/Kg) după care se trece la descoperirea nervului vag(Fig.34)

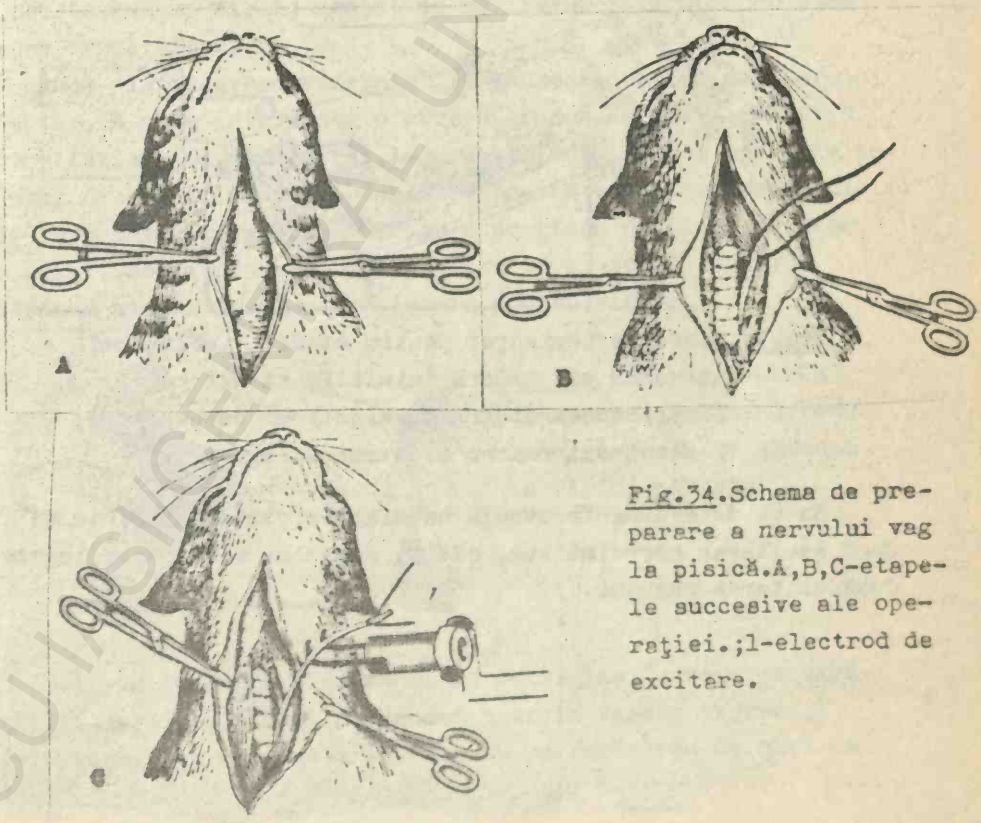


Fig.34.Schema de preparare a nervului vag la pisică.A,B,C-etapele succesive ale operaţiei.;1-electrod de excitare.

Se secţionează tegumentul pe linia mediană.Cu ajutorul unui bisturiu bont despicam musculatura şi exteriorizăm trahea.Se prepară pe părţile laterale ale traheii pachetul vasculo-nervos. Obişnuit la pisică sînt 2 nervi:n.vag(mai gros şi de culoare alb strălucitoare) şi nervul simpatic (de culoare roz cenuşie şi mai subţire); la 15% din pisici se află şi al 3-lea nerv-nervul depresor.Prin disecţie cu capătul bont al bisturiului, se izolează nervul vag pe o distanţă de 1-2 cm şi se aplică o ligatură(Fig.34b).

Se trece la pregătirea electrocardiografului.Pentru aceasta electrozii sub forma acelor de injecţie(sau plăci aplicate pe porţiuni depilate şi umectate cu soluţie fiziologică) se introduc în membrele pisicii şi se dă drumul electrocardiografului pe derivaţia corespunzătoare(Fig.35).Se înregistrează ECG de fond, după care se excită nervul vag 3-10 secunde şi se înregistrează din nou ECG.

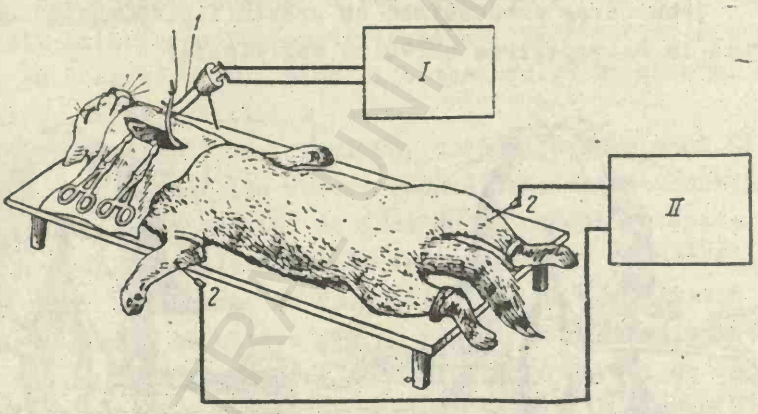


Fig.35.Schema experienţei pentru studiul influenţei nervului vag asupra inimii.I- stimulator; II-electrocardiograf;1-electrozi de excitare; 2-electrozi pentru electrocardiografie.

Se va determina frecvenţa cardiacă a pisicii înainte şi după excitarea nervului vag, cît şi aspectul electrocardiogramei după ecitarea vagului.

24. INIMA DE BROASCA TESTOASA.

Inima de broască ţestoasă constituie unul din cele mai rezistente preparate pentru studiul activităţii cardiace.După exteriorizarea inimii, contractilitatea ei poate fi studiată timp de cîteva ore fără asigurarea unor condiţii speciale.

In această lucrare se vor verifica multe din proprietăţile inimii, care au fost demonstrate pe broască.Lucrarea se pretează pentru recapitularea fiziologiei inimii.

Material necesar:kimograf;două peniţe Engelmann;bobină de inducţie;semnal electromagnetic Deprez;planşetă de disecţie; instrumentar;soluţii indicate mai jos.

Pregătirea broaştei ţestoase:se preferă ţestoase cu o carapace de 15-20 cm.In vederea paralizării, se apucă puternic de gît broasca,imediat posterior capului,încît aceasta să nu poată fi retractat.Cu ajutorul unei sonde ascuţite,rezistente, se trepanează un orificiu în craniu şi se distruge creierul.Se astupă orificiul cu un tampon de vată, pentru a evita hemoragia.Dacă craniul este gros,se trepanează craniul cu un forceps de oase. Dacă broasca evită apucarea gîtului şi a capului, se va folosi un cleşte sau un cîrlig agăţat de maxilarul inferior, cu care tragem capul afară.

După distrugerea creierului,se găureşte vîrful maxilarului inferior,în care introducem o sfoară groasă.Ea va fi folosită pentru întinderea gîtului şi legarea lui de masa de operaţie în vederea disecării nervului vag.Se trece la exteriorizarea inimii. Unii cercetători preferă a decupa o porţiune de plastron deasupra inimii.Secţiunea se poate realiza cu ajutorul unui ferăstrău ataşat la un motor tehnic dentar(Fig.36.)

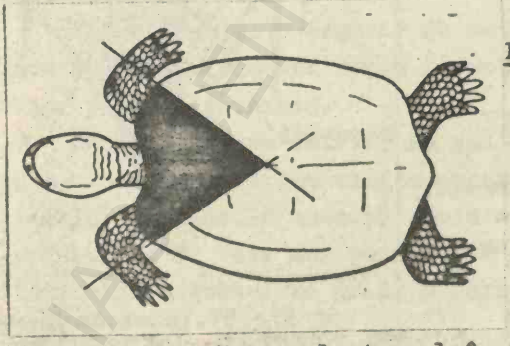


Fig.36. Faţa ventrală a ţestoasei,indicînd zona din plastron ce urmează a fi îndepărtată.

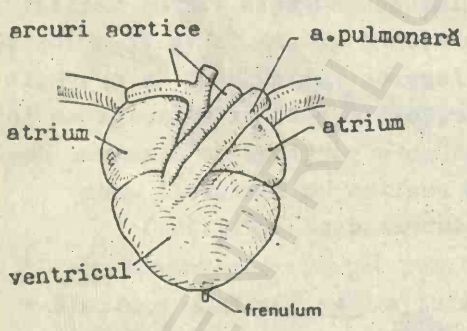
Noi vom înlătura plastronul în întregime în vederea expunerii viscerelor,şi unui acces mai uşor la vasele majore şi nervii vagi.Pentru aceasta se taie cu un ferăstrău de oase la

limita dintre carapace şi plastron; după tăierea marginilor cu ferăstrăul, osul mai gros la graniţa antero- şi postero-laterală a joncţiunii dintre carapace şi plastron, se preferă a se rupe cu un forceps de oase.Tăiem pielea groasă cu un foarfece mare,la limita marginii anterioare şi posterioare, aproape de plastron.Cu un bisturiu ascuţit, tăiem ţesuturile foarte aproape de plastron, după care se înlătură plastronul.Pentru a evita hemoragia, este important de a ţine lama bisturiului apăsată de plastron în momentul cînd îl degajăm.

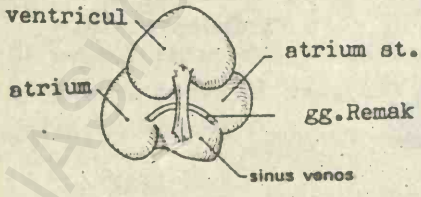
Se leagă animalul de masa de operaţie şi se întinde gîtul, fixîndu-l în poziţie complect extinsă prin intermediul sforii introduse în maxilarul inferior.

Masa de disecţie trebuie să fie cam cu 10 cm mai lungă decît carapacea(20X30 cm pentru o broască de 20cm) şi 5-8 cm grosime.Partea centrală a mesei prezintă o scobitură în care intră carapacea;un capăt al mesei are un şanţ, în care intră gîtul; cîrligele din marginea mesei servesc la prinderea picioarelor.

Se despică cu atenţie pericardul şi se exteriorizează inima (Fig.37).



Faţa ventrală.



Faţa dorsală.

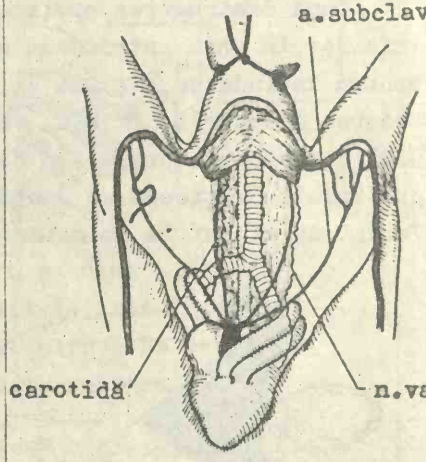


Fig.37.Inima de broască ţestoasă şi inervaţia ei.

Se determină frecvenţa de contracţie a inimii.Se taie frenul, un ligament ce leagă vîrful ventriculului de membrana pericardică.Se va nota secvenţa contracţiilor în sinusul venos,auricule şi ventricul.

Se disecă nervii vagi la nivelul gîtului.Ei se găsesc de fiecare parte a traheii, în contact cu artera carotidă şi vena jugulară internă(vezi Fig.37).Se introduce cîte un fir de aţă pe sub fiecare nerv vag.

Se prinde un serfin de atriu şi unul de vîrful ventriculului şi se leaga fiecare la cîte o peniţă Engelmann. Inscriem pe kimograf.

Procedee experimentale:

Se excită timp de 3 secunde vagul cu un curent tetanizant, puţin supraliminal.Inregistrăm efectul.Se va măsura perioada latentă(timpul dela aplicarea excitantului şi pînă la apariţia efectului) cu ajutorul unui semnal electromagnetic Deprez şi se va nota timpul de revenire la ritm normal.Se va mări intensitatea excitantului şi se va excita din nou timp de 3 secunde.De notat dacă efectul se observă la nivelul sinusului,auriculelor, ventriculului sau în toate părţile inimii.Inima se opreşte în diastolă sau în sistolă?

După aceasta se va excita vagul un timp mai îndelungat.Se va observa„scăparea inimii" de sub influenţa vagului.In acest caz timpul de excitare va fi în jur de 10 secunde sau ceva mai mult.Pe tot timpul experienţei, nervul trebuie ţinut umed.Dacă nu obţinem „ scăparea inimii" s-ar putea să fie nevoie de a modifica intensitatea excitantului sau nervul excitat să nu fie vagul.

Se va încălzi o baghetă de metal pînă la 40°C şi se va aplica în zona sinusului venos.De notat efectul încălzirii şi a altor părţi ale inimii.

După revenirea inimii, se aplică un excitator pe ventricul cu ajutorul căruia vom excita muşchiul în diferite perioade ale ciclului cardiac.In această parte a experienţei, viteza kimografului va fi ceva mai mare.Se va afla perioada din ciclul cardiac, cînd muşchiul se află în faza refractară absolută şi relativă.

Se va măsura durata a trei cicluri normale şi în situaţia cînd s-a indus o extrasistolă urmată de pauză compensatoare.

Ridicînd inima , se observă o arie semilunară de culoare albă la limita dintre auricule şi sinusul venos(vezi Fig.37). La acest nivel, fibrele preganglionare ale n. vag, sinapsează cu fibrele postganglionare ale muşchiului cardiac.Este ganglionul Remak.Se va excita acest ganglion şi se va înregistra efectul.

Se vor înregistra aproximativ 12 cicluri cardiace pe kimograf cu viteză redusă,după care aplicăm cîteva picături de acetilcolină 1%.Se va marca pe kimograf timpul de aplicare.După observarea efectului(uneori chiar oprirea inimii) se aplică sulfat de atropină 0,5%.După o perioadă latentă, se observă o accelerare.Excităm după aceasta ganglionul Remak.Excităm n.vag.

Se poate înregistra ECG,sau după revenirea inimii de sub efectul medicamentelor, se induce un bloc cardiac aplicînd legătura a treia a lui Stannius(la limita dintre atrii şi ventricul); strîngem treptat nodul de aţă, pînă se observă efectul.Se înlătură nodul de aţă şi se va observa dacă inima revine.

Se secţionează ventriculul de auricule.Se fixează baza ventriculului pe o masă de pluta.Pentru aceasta se face o legătură cu aţă în jurul bazei ventriculului.Vîrful ventriculului îl legăm de peniţa Engelmann.Excităm ventriculul cu intensităţi sub prag.Mărim treptat intensitatea curentului şi înregistrăm efectul.Se observă un răspuns gradat al muşchiului cardiac?(De ce?) Se va defini legea tot sau nimic.Cum putem modifica contracţia inimii?.

Recomandări:se va ataşa cîte o kimogramă,pentru a ilustra toate aspectele efectuate.

FACTORII MECANICI CARE INTERVIN IN REGLAREA ACTIVITATII INIMII.

25.LEGEA INIMII.

Această lege demonstrează proprietatea intrinsecă a muşchiului cardiac,de a-şi ajusta forţa de contracţie funcţie de masa de sînge pe care o conţine,deci funcţie de volumul presistolic. Volumul presistolic al cavităţii ventriculare, variază pe de o parte în raport cu presiunea venoasă, iar pe de altă parte, funcţie de rezistenţa periferică opusă scurgerii.Ori de cîte ori apar variaţii ale acestor doi indici, muşchiul cardiac îşi adap-

tează în aşa fel forţa de contracţie încît devine apt de a expulza toată cantitatea de sînge care vine prin flux venos.

Prin studiile efectuate pe muşchii scheletici, s-a constatat că forţa de contracţie a muşchiului depinde în anumite limite de gradul de întindere a lui înaintea intrării în contracţie.

Acelaşi lucru este valabil şi în cazul muşchiului cardiac. Intinderea fibrei musculare cardiace este cauzată de volumul de lichid conţinut.In cazul creşterii afluxului venos, inima în timpul primelor revoluţii cardiace, nu va reuşi să expulzeze toată cantitatea de lichid care o irigă, rămîne deci un reziduu postsistolic.Creşterea volumului lichidului postsistolic. întinde tot mai mult muşchiul, care în cele din urmă va căpăta forţa necesară de a expulza toată cantitatea de lichid ce pătrunde în inimă.Acelaşi lucru se întîmplă şi în cazul modificării rezistenţei periferice.

Aceste fapte, observate de către Starling şi colaboratori (1914), l-au dus la enunţarea a ceeace se numeşte legea inimii, care arată că forţa de contracţie a miocardului este proporţională cu gradul de întindere iniţială a fibrei miocardice.Ea a fost demonstrată de către autorii citaţi, pe cîine prin preparatul „inimă-plămîn", dar poate fi demonstrată şi pe inima de broască in situ prin măsurarea minut-volumului.Modificarea presiunii venoase, se realizează prin gradul de deschidere a robinetului dela vasul Mariotte(sau pîlnia de separare) de unde lichidul pătrunde în vena cavă inferioară, care a fost canulată. Circulaţia sistemică este modelată printr-un tub de sticlă aşezat vertical, care prezintă descnideri laterale ce permit modificarea presiunii sistemice prin pensarea succesivă a tuburilor de cauciuc.Acest vas este legat de un ram al trunchiului arterial.

Material necesar:canule de perfuzie;vas Mariotte;tub de sticlă cu ramificaţii laterale;soluţie Ringer.

Tehnica: se paralizează broasca, se descoperă inima, se curăţă vena cavă inferioară sub care introducem un fir de aţă. Se introduce de asemeni cîte un fir de aţă pe sub trunchiul arterial drept şi stîng.

Se leagă trunchiul arterial drept.Se practică o butonieră în vena cavă inferioară, cît mai distal de sinusul venos prin

care se introduce o canulă şi se leagă cu firul de aţă.

Se începe perfuzarea inimii cu soluţia Ringer.Se introduce o a doua canulă în trunchiul arterial stîng, se leagă cu firul de aţă şi se racordează la tubul cu ramificaţii.

Adaptarea inimii o verificăm prin înregistrarea frecvenţei cardiace,a minut-volumului cardiac(măsurat cu o eprubetă gradată), iar cu ajutorul cardiometrului s-ar putea înregistra şi forţa de contracţie.Denervăm inima.

A).Influenţa presiunii venoase asupra inimii:se menţine rezistenţa periferică constantă(colectăm de la prima ramificaţie a tubului vertical) şi se înregistrează minut-volumul şi frecvenţa la diferite presiuni venoase.Se constată că frecvenţa nu se modifică în schimb minut-volumul cît şi forţa de contracţie, cresc paralel cu presiunea venoasă.

B).Influenţa rezistenţei periferice:se fixează un debit mediu de irigare(3-4 ml pe minut), pe care îl menţinem constant. Se măsoară minut-volumul de la prima ramificaţie, apoi de la a doua s.a.m.d.Măsurarea începe după cîteva(3-4) revoluţii cardiace, timp în care inima reuşeşte să se adapteze.Se constată că minut-volumul cît şi frecvenţa rămîn constante în schimb creşte forţa de contracţie.

Acest mod de comportare al inimii se observă numai în cazul cînd preparatul este denervat.La o inimă în situ cu inervaţia normală,adaptarea se face în alt mod.Astfel în cazul creşterii presiunii venoase, are loc şi o creştere a frecvenţei cardiace (reflexul Bainbridge).Prin creşterea presiunii arteriale, are loc o scădere a frecvenţei;între presiune şi frecvenţă există un raport invers proporţional(legea lui Marey).

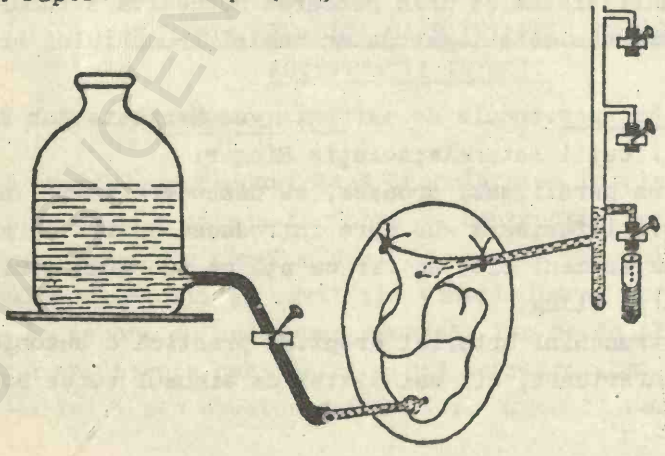


Fig.38.Schema pentru demonstrarea legii inimii.

CAPITOLUL III.

FIZIOLOGIA SISTEMULUI VASCULAR.

Circulaţia sîngelui prin vase, constituie o condiţie obligatorie pentru întreţinerea schimburilor respiratorii şi a metabolismului tisular. Activitatea inimii şi a întregului sistem vascular este adaptată tocmai în vederea creierii celor mai eficace condiţii pentru schimburile dela nivelul capilarelor.

Deplasarea sîngelui prin arborele circulator, se supune legilor hidrodinamice. Hemodinamica este reglată de factori nervoşi şi umorali. Vasele posedă un anumit grad de elasticitate iar pereţii lor se află într-o stare de tonus, menţinut de impulsurile nervoase plecate din centrul vasomotor. Prin excitarea receptorilor de pe traectul vaselor, care sînt concentrate în zone reflexogene, pot apare modificări reflexe ale circulaţiei sanguine. Ele pot apare, de asemeni, în urma excitării chemo- şi mecanoreceptorilor din organele interne cît şi a exteroceptorilor.

In cele ce urmează, vor fi expuse cîteva metode folosite pentru cercetarea funcţiei sistemului vascular.

26. PRESIUNEA ARTERIALA LA OM.

Sîngele se găseşte în artere sub presiune, determinată de multipli factori: 1-acţiunea de pompă a inimii; 2-rezistenţa periferică; 3-cantitatea de sînge în sistemul arterial; 4-vîscozitatea sîngelui; 5-elasticitatea pereţilor arteriali.

Presiunea sanguină constituie un indicator fin al stării generale a organismului, din care cauză determinarea ei prezintă importanţă practică. La om presiunea arterială ar putea fi măsurată şi direct, introducînd într-o arteră un ac cu lumen mare, pe care îl punem în legătură cu un manometru cu mercur. In clinică se preferă însă metode indirecte, care sînt lipsite de riscuri. Principiul acestor metode constă în echilibrarea presiunii unui volum de aer cu presiunea sîngelui din artera humerală şi determinarea primei presiuni cu ajutorul unui manometru cu mercur sau aneroid.

A. Metoda auscultatorie.

Rezultatele cele mai exacte ale valorii presiunii arteriale, se obţin cu ajutorul metodei ausculatorii, introdusă de

Korotkov(1905).Drept criteriu pentru presiunea sistolică şi cea diastolică se folosesc anumite sunete auzite în timpul auscultării arterei humerale în perioada decomprimării ei.In artere necomprimate circulaţia sîngelui nu este însoţită de vreun zgomot.Dacă însă artera este comprimată de manşeta manometrului, astfel ca sîngele să fie complet oprit pentru un moment, se va auzi un sunet în ritmul bătăilor cordului în momentul în care presiunea din manşetă va scădea suficient pentru a permite trecerea unui val de sînge.Pe măsură ce presiunea din manşetă coboară, sunetul suferă o serie de modificări, care permit stabilirea presiunii din vas.

Echipament necesar:sfigmomanometru;stetoscop.

Sfigmomanometru este format dintr-o cameră dublă de cauciuc învelită la exterior cu un material textil inextensibil, care este legată cu un manometru, ce măsoară presiunea din cameră şi o pară de cauciuc prevăzută cu un ventil pentru modificarea presiunii din manşetă.

Tehnica:persoana examinată stă cu mîna stîngă sprijinită pe masă.Se aplică manşeta în jurul braţului, fără a comprima ţesuturile(Fig.39).Fonendoscopul sau stetoscopul se aplică pe porţiunea inferioară a arterei humerale,distal de manşetă şi se pompează aer în manşetă pînă la dispariţia pulsului.După aceasta scădem lent presiunea din manşetă cu ajutorul şurubului de descărcare, urmărind indicaţiile manometrului şi zgomotele recepţionate prin stetoscop.Indicaţia manometrului în momentul apariţiei primului zgomot, constituie valoarea presiunii sistolice.Continuînd decomprimarea vasului zgomotele se amplifică, iar la un moment dat, dispar. Presiunea din manşetă indicată de manometru în momentul dispariţiei zgomotului, constituie presiunea diastolică.Se repetă măsurarea de

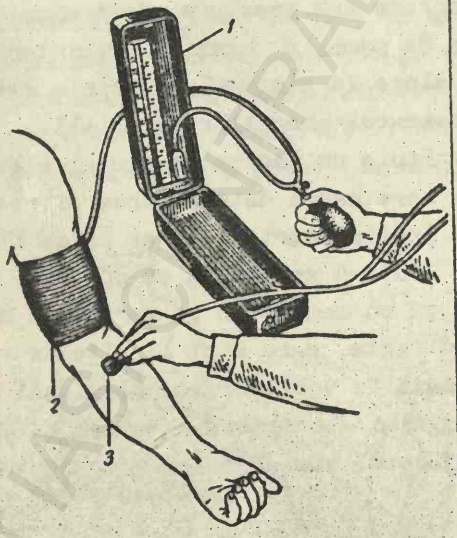


Fig.39.Măsurarea presiunii sanguine.1-manometru;2-manşeta; 3-stetoscop

trei ori şi se iau în consideraţie valorile minime obţinute. De ce?

B.Metoda palpatorie(Riva-Rocci).

In această metodă auscultaţia zgomotelor este înlocuită cu palparea pulsului în artera radială.Presiunea maximă(sistolică) este dată de indicaţia manometrului în momentul apariţiei pulsului, iar presiunea minimă(diastolică), este dată de indicaţia manometrului,în momentul când tensiunea pulsului încetează să mai crească.

Obţinuit o pulsaţie a radialei,detectabilă cu degetul, apare după scăderea presiunii din manşetă cu 5-10 mm sub punctul la care artera devine pentru prima oară permeabilă.Deaceea metoda palpatorie dă valori prea mici.Deasemeni presiunea diastolică nu poate fi măsurată în mod satisfăcător.

Valori normale: în medie presiunea sistolică a unui bărbat tînăr, în repaos mintal şi fizic, în poziţie şezîndă, este de obicei de 120mm Hg,cea diastolică-80mmHg.,presiunea medie-100 mmHg iar presiunea pulsului-40mmHg.

O creştere cu 15 mm Hg pentru sistolică şi cu 8mmHg, pentru cea diastolică, este considerată ca hipertensiune.O scădere a presiunii sub 110 mmHg la un bărbat adult, sau sub 100 mmHg la o femeie adultă, de orice vîrstă, este catalogată ca hipotensiune.

Recomandări: se vor înregistra valorile presiunii obţinute şi se vor compara cu valorile normale.Se vor compara rezultatele obţinute prin cele două metode.

Intrebări de control.Care sînt factorii, care determină valorile presiunii arteriale?.Cum se modifică presiunea arterială în diferite condiţii fiziologice? Este metoda auscultatorie a lui Korotkov, este mai adecvată măsurării presiunii arteriale a sîngelui?.

BCU IASI CENTRALA LIBRARY

27.PRESIUNEA ARTERIALA LA ANIMALE SI REGLAREA EI.

La animale se preferă metode directe de determinare a presiunii sanguine, prin racordarea vaselor cu ajutorul canulelor, la manometru cu mercur.In exerciţiul de mai jos, se descrie un procedeu direct de măsurare a presiunii sanguine la iepure şi studiul unor factori regiatori ai circulaţiei sanguine.

In acest scop se vor canula artera carotidă pentru măsurarea presiunii sanguine;vena jugulară,pentru administrarea substanţelor de testat.

Material necesar:manometru cu mercur;kimograf;pneumograf; tambur Marey;masa de operaţie;instrumentar operator;canule; substanţe indicate mai jos.

Pregătirea operaţiei:se aranjează aparatul de înregistrat presiunea, ca în Fig.40.

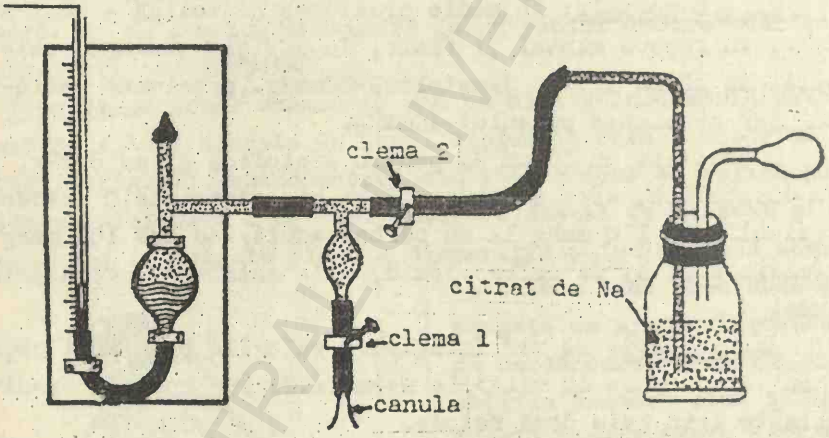


Fig.40.Aparat de înregistrat presiunea sanguină la animale.

Deschizînd cu grijă clema 2, mărim presiunea din vasul cu citrat de sodiu(anticoagulant) cu ajutorul parei de cauciuc, încît mercurul să urce în ramul stîng al mamometrului pînă la aproximativ 120mmHg.Trebuie avută grijă de a scoate toate bulele de aer din tuburi, ele rămînînd pline cu anticoagulant.După aceasta închidem clema 2.Verificăm dacă peniţa flotorului se mişcă liber între firul de ghidaj şi kimograf.

Toate soluţiile de injectat au fost pregatite şi plasate în baie la 38°C.Nu sînt necesare condiţii de sterilitate,deoa-

rece este un experiment acut şi după efectuarea tuturor observaţiilor, iepurele se sacrifică.

Anestezia:se alege un iepure tînăr şi se cîntăreşte.Se preferă iepurele nu prea gras, căci excesul de grăsime din zona gîtului îngreuiază disecţia.Doza de nembutal este de 35-40 mg/Kg.g.c.;concentraţia soluţiei=15mg/ml(1,5%).Injectăm în vena marginală a urechii aproximativ 1/3 din doza calculată de anestezic.Se aşteaptă 2-3 minute pentru ca anestezicul să-şi exercite efectul, după care injectăm lent doza întreagă de nembutal pînă cînd iepurele devine complet anesteziat şi respiră regulat. Fiind mult mai sensibil la nembutal comparativ cu pisica sau cîinele, iepurele poate fi uşor omorît daca administrăm prea rapid anestezicul.

Tehnica chirurgicala:se tunde blana de pe faţa ventrală a gîtului.Fixăm animalul de o masă de operaţie cu faţa ventrală în sus.

Canularea traheii:cu un bisturiu facem o incizie mediană a tegumentului dela bărbie pînă la partea anterioară a toracelui. Se exteriorizează trahea prin disecţie cu capătul bont al bisturiului.Se eliberează trahea de ţesuturile înconjurătoare şi aplicăm două ligaturi sub ea.Tesuturile expuse, se menţin pe tot parcursul experienţei umectate cu soluţie fiziologică pentru mamifere.Alegem o canulă traheală de mărime corespunzătoare.Ridicăm trahea cu un fir de aţă şi facem o secţiune unghiulară la mijlocul ei, îndreptată spre plamîn.Apucăm cu o pensă marginea secţiunii făcute şi introducem canula în lumen cu capătul deschis spre plămîn, după care o legăm strîns;tăiem capetele aţei.

Izolarea nervilor:se exteriorizează pachetul vasculo-nervos de pe ambele părţi ale traheii, în compoziţia căruia intră artera carotidă,n.vag,simpatic şi depresor(la iepure depresorul merge separat).Izolăm cu atenţie nervii, cînd vom observa un nerv mai gros şi două fire nervoase mai subţiri, ce acompaniază carotida.Nervul vag este cel mai gros;lipit de el se află nervul simpatic cervical.Alt nerv subţire este depresorul.Identificarea acestor doi nervi subţiri, se va face ulterior prin excitarea lor directă.Se trece cîte o ligatură lejeră pe sub fiecare nerv,încît s-o putem desface.Umectăm nervii cu un tampon de vată imbibat în soluţie fiziologică.

Canularea venei jugulare: exteriorizăm vena jugulară pe partea stîngă, prin disecţie cu capătul bont al bisturiului.

Acest vas este superficial şi lateral faţă de carotidă(Fig.41a). Legăm strîns capătul cefalic(superior).Cu o pensă arterială mică, pensăm vasul la distanţă cît mai mare de inimă.Intre ligatură şi pensă secţionăm o porţiune din peretele vasului cu vîrful unui foarfece de iris, la distanţă de cîţiva mm de ligatură.Prindem marginea tăiată cu o pensă,pentru expunerea lumenului, prin care introducem canula(tub de polietilen 160), o impingem cît mai aproape de pensă(spre inimă), după care o legăm de vas cu cea de a doua ligatură.Canula a fost umplută în prealabil cu heparină 1%.Ataşăm canula la un ac de seringă Nr 18 şi în continuare la o seringă.Substanţele de testat vor fi administrate pe această cale.Injectăm în animal 2ml soluţie heparină 1%.

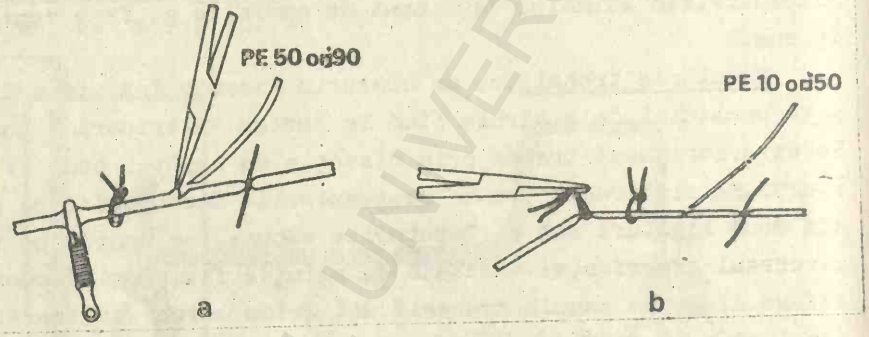


Fig.41.Procedee de canulare a vaselor sanguine mari(a) sau mai mici(b).PE=tub de polietilen.

Canularea arterei carotide stîngi:se expune carotida pe o distanţă de 3 cm, pe care o canulăm(Fig.41a) cu un tub de polietilen 90.Canula este deasemeni îndreptată spre inimă.Capătul celălalt al canulei se racordează la manometru cu Hg., la care am ridicat iniţial presiunea pînă la 120mm Hg(pentru a evita intrarea sîngelui în tuburile de legătură cu manometru).

Aranjăm un pneumograf în jurul părţii anterioare a abdomenului, pe care-l conectăm la un tambur înscriitor Marey şi înregistrăm pneumograma pe kimograf.Avem grijă ca cele două peniţe să plece dela acelaşi nivel.

Procedee experimentale.

1.Inregistrăm pe un kimograf cu viteză mică,presiunea san-

guină normală şi pneumograma.Pe curba presiunii sanguine, se observă mici unde, sau unde de prim ordin(unde cardiace)(Fig. 42a),corespunzătoare ridicării presiunii în perioada sistolei. De asemeni se observă unde respiratorii de ordinul al doilea (unde respiratorii)(Fig.42b).In inspiraţie presiunea sanguină creşte şi invers(Fig.43).Cîteodată se pot observa unde de ordinul trei, determinate de modificările periodice ale lumenului general al arborelui vascular, mai ales la nivelul vaselor mici, alcătuind curbele lui Meyer(Fig.42 c).La înregistrarea acestor tipuri de unde, viteza kimografului va fi ceva mai mare(3cm/minut).

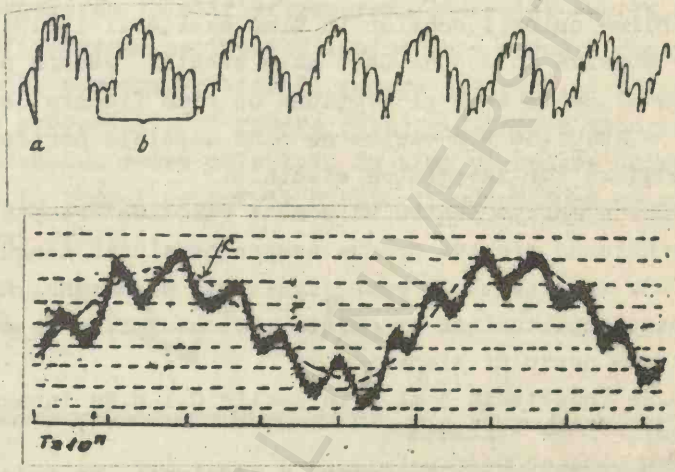


Fig.42.Curbele presiunii sanguine.a-unde cardiace b-unde respiratorii;c-curbele lui Meyer.

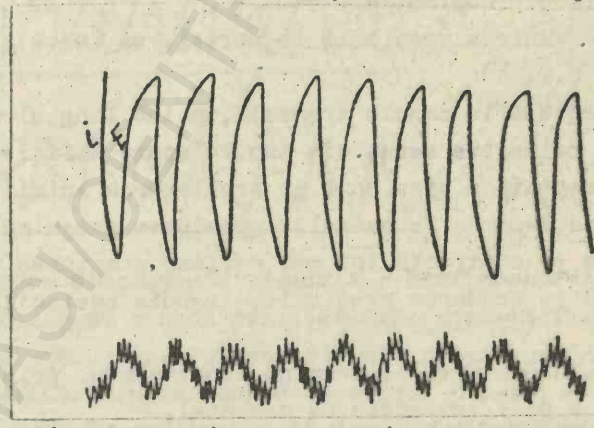


Fig.43.Inscrierea concomitentă a pneumogramei(sus) şi presiunii sanguine(jos).I=inspiraţie; E=expiraţie.

2.Ridicăm cu atenţie n.vag drept cu firul de aţă şi introducem sub el un al 2-lea fir de aţă.Aplicăm o legătură strînsă în jurul nervului şi observăm variaţiile presiunii sanguine.Aplicăm a doua ligatură pe nerv,după care îl secţionăm între ligaturi.Capătul periferic al vagului se aplică pe electrozi şi se excită cu un curent tetanizant timp de 10-15 secunde.De observat latenţa răspunsului,scăderea presiunii sanguine şi revenirea ulterioară.După aceasta excităm capătul central al nervului vag secţionat.Cum explicaţi răspunsul obţinut?

3.Se vor excita pe rînd nervii simpatic si depresor de pe partea stîngă.Recunoaştem nervul simpatic dupa dilatarea pupilei şi albirea culorii ochilor în urma excitării lui.Ultimul efect nu se observă totdeauna.Care este efectul asupra presiunii sanguine?.Se va lega şi secţiona pe rînd fiecare nerv,ca şi în cazul vagului.Se vor excita pe rînd capetele periferice şi centrale şi se vor înregistra efectele.

4.Se comprimă pentru un moment carotida dreaptă, cu o pensă şi se notează efectul produs asupra presiunii sanguine.

5.Se injectează în vena jugulară 1 ml adrenalină(1:50.000). De notat amplitudinea şi durata răspunsului.Se va compara cu excitarea nervului simpatic.

6.Se injectează 3 ml acid lactic 0,1 M.Se înregistrează efectul.

7.După revenirea la normal a presiunii, se injectează 3 ml $NaHCO_3$ 0,1 M.De explicat efectul acidului şi bicarbonatului asupra presiunii şi respiraţiei.

8.După revenirea presiunii la normal, se injectează vasopresină 0,5 U.I.

9.Se ataşează la canula traheală,un tub lung şi se lasă iepurele să reinspire aerul din tub.Va apare asfixia.De notat creşterea treptată a presiunii şi accelerarea inimii.După aproape 2-3 minute(depinde de animal), presiunea sanguină începe să scadă, inima se contractă tot mai rar,iar presiunea venoasă creşte.Odată cu scăderea presiunii, trebuie restabilită respiraţia.

10.In cele din urmă se termină experimentul prin injectarea în jugulară a unei supradoze de nembutal.

Recomandări:se vor explica toate observaţiile făcute şi se va răspunde la întrebările puse mai sus.De ataşat cîte o kimogramă de fiecare variantă experimentală.

28. PULSUL ARTERIAL.

Prin puls înţelegem oscilaţiile periodice ale pereţilor vaselor sanguine, care iau naştere sub influenţa contracţiilor inimii.

El poate fi înregistrat sub forma unei curbe, dacă se plasează o pîrghie uşoară pe o arteră, de exemplu radială, şi i se înscriu excursiile pe o suprafaţă, care se mişcă pe măsură ce artera se dilată şi se retrage sub ea. Acest lucru se realizează cu ajutorul sfigmografului, curba înregistrată purtînd numele de sfigmogramă. Forma pulsului diferă după cum înscrierea se face în apropierea inimii (sfigmograma centrală) sau la distanţă de ea (sfigmograma periferică). Curba este formată dintr-o linie ascendentă, aproape verticală, ramura anacrotă, şi una descendentă, care coboară gradat - ramura catacrotă. Ramura anacrotă reprezintă începutul undei pulsului, în timp ce ramura catacrotă este înscrisă în timpul coborîrii pîrghiei, adică după ce vîrful undei a fost depăşit.

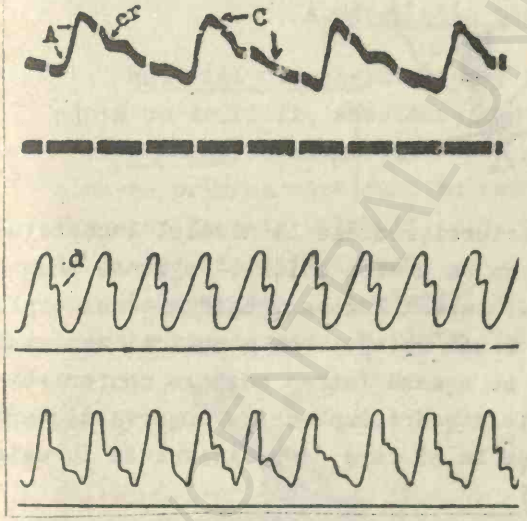


Fig.44. Forme de sfigmograme. A-unda anacrotă; C-unda catacrotă; cr-crestătura dicrotă; d-unda dicrotă. In rîndul de jos se observă unde pre- şi postdicrote.

Ramura descendentă prezintă o undă negativă, crestătura dicrotă, urmată de o undă pozitivă, unda dicrotă (Fig.44). Uneori pot exista unde pre- şi postdicrote. Crestătura dicrotă este dată de refluarea neînsemnată de scurtă durată, a sîngelui, care închide valvele aortice. Odată împinse către cavitatea ventriculară, valvele aortice sînt puse sub tensiune, mişcarea coloanei de lichid spre inimă este oprită brusc şi sîngele ricoşează de

pe suprafaţa lor.Aceasta produce o modificare de presiune pozitivă, care apare pe sfigmogramă ca unda dicrotă.

Material necesar:sfigmograf;cronograf.

Există cîteva tipuri de sfigmografe, dar toate se bazează pe recepţionarea pulsaţiilor arterelor de către butonul explorator p(Fig.45) al aparatului şi transmiterii acestei pulsaţii prin intermediul unui sistem de pîrghii spre peniţa înscriitoare, care trasează deflexiunile pe un dispozitiv în mişcare.Dispozitivul de înregistrare poate fi o parte componentă a aparatului sau de sine stătător(kimograf, înscriptor etc.)

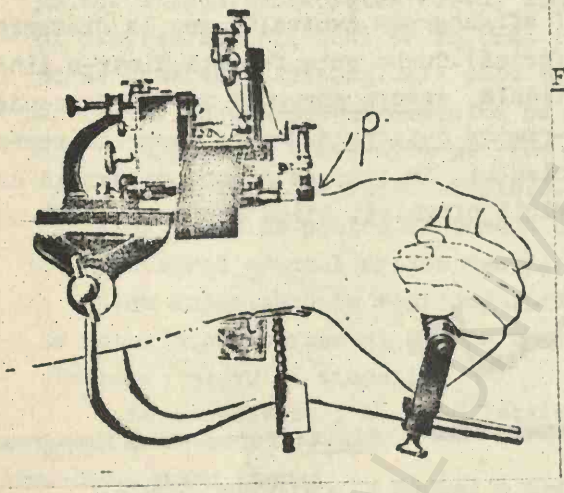


Fig.45.Modul de aranjare al sfigmografului. P=buton explorator.

Se determină poziţia arterei radiale la nivelul încheieturii mîinii şi se marchează cu un creion colorat regiunea unde pulsul este cel mai intens.In acest loc se aşează butonul explorator al sfigmografului şi fixăm cu ajutorul panglicei aparatul în jurul antebraţului.Mîna se aşează într-o poziţie confortabilă,încît să nu poată executa mişcări.După ce se observă mişcarea peniţei înscriitoare,se pune în mişcare dispozitivul de înregistrare.

Pe una din curbele obţinute, se va indica denumirea deflexiunilor, iar prin linii verticale se va delimita începutul şi durata sistolei şi respectiv a diastolei ventriculare.Pentru a afla valorile absolute ale duratei fazelor, se înscrie timpul cu ajutorul cronografului(dacă dispozitivul de înregistrare permite acest lucru).

29.CIRCULATIA CAPILARA.

William Harvey(1578-1657) a demonstrat experimental că sîngele este pompat din artere în vene,fără a putea însă demonstra legăturile dintre vase.După aproape o jumătate de secol Marcello Malpighi(1628-1694) a observat,cu ajutorul microscopului său primitiv,capilarele la nivelul plămînului şi mezenterelor de broască,înţelegînd semnificaţia lor în conectarea acestor două grupe de vase sanguine.Antony van Leeuwenhoek(1632-1723) a generalizat prezenţa capilarelor la nivelul tuturor ţesuturilor.Alte date privind istoricul studiului capilarelor, pot fi găsite în Fulton şi Wilson(1966).

Astăzi se admite că prin capilare se realizează nu numai legătura dintre arteriole şi venule, ci la nivelul lor au loc intense schimburi metabolice dintre sistemul vascular şi ţesuturi:substanţele nutritive,gazele respiratorii şi mesagerii chimici, trec prin peretele lor endotelial.In această lucrare se va examina circulaţia capilară la cîteva grupe de organisme şi se vor repeta unele experienţe de fiziologie clasică.

A.Circulaţia capilară la broască.

Material necesar:Microscop cu micrometru ocular;masă de plută cu orificii; anestezic;instrumentar de disecţie.

Tehnica:se alege o broască mai puţin pigmentată.Imobilizăm broasca prin narcoză cu eter sau cloroform;anestezie cu uretan (în sac limfatic 0,5ml 1%) sau prin injectarea a 0,02 ml curare 1% în sac limfatic dorsal.

1.Observarea circulaţiei în membrana interdigitală. Se pune broasca pe planşeta de plută(Fig.46).

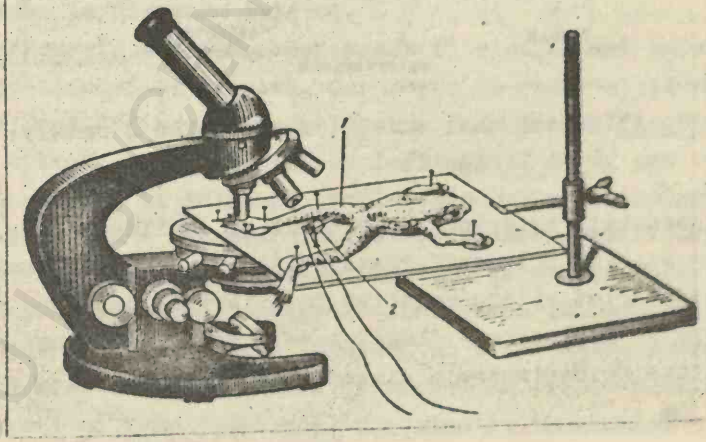


Fig.46. Modul de aranjare a broaştei pentru observarea circulaţiei capilare.1-nerv; 2-excitator.

Membrana interdigitală a labei posterioare(de preferat între degetul II şi III) se întinde cu ajutorul boldurilor,deasupra orificiului din plangeta de plută(Ø 2cm).Pentru a evita oprirea circulaţiei, membrana nu trebuie întinsă prea tare.Se mută preparatul pe masa microscopului şi se examinează cu un obiectiv slab regiunea cea mai caracteristică.

2.Circulaţia în mezentere.Se face o incizie laterală a tegumentului şi peretelui abdominal pe o distanţă de 1 cm şi se deschide cavitatea abdominală.Se scot cu atenţie ansele intestinului subţire împreună cu mezenterul.Intindem uşor mezenterul deasupra orificiului din plută şi îl fixăm cu bolduri.Din timp în timp se umectează cu soluţie fiziologică.Se va examina cu un microscop(amplificare redusă).

3.Circulaţia în limbă.Limba udată cu soluţie fiziologică, se întinde deasupra găurii din plută şi se fixează cu bolduri.

Circulaţia capilară poate fi observată şi în ţesutul pulmonar sau vezica urinară.

Observarea.Se va observa circulaţia în capilare şi se va face o schemă.Puteţi identifica vasele din Fig.47?.

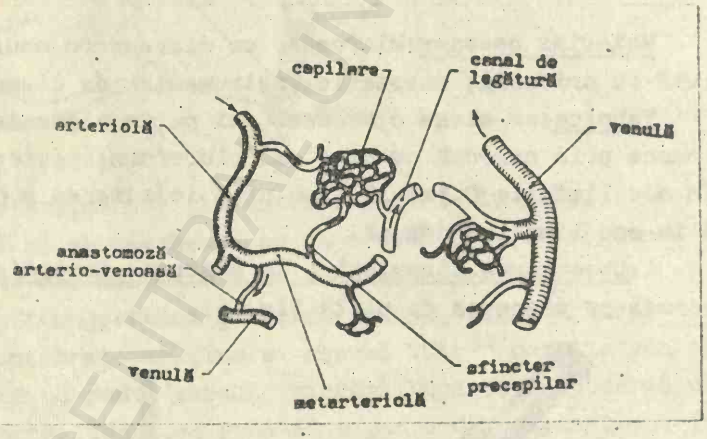


Fig.47.Schema unei unităţi funcţionale a patului capilar.

Cum deosebiţi arteriolele,venulele şi capilarele?.Se observă anumite vase ce pulsează? Toate capilarele conţin elemente celulare?.De notat viteza relativă în arteriole,capilare şi venule.Viteza de deplasare a sîngelui este aceeaşi în toate capilarele?Viteza de deplasare a elementelor figurate, este aceeaşi

în centrul şi marginea arteriolelor şi venulelor? Mărind amplificarea, încercaţi sa observaţi fenomenul de diapedeză. După ce răspundeţi la toate întrebările puse, se trece la partea experimentală.

Procedee experimentale:

A. Acţiunea medicamentelor. Se va observa cu atenţie o arteriolă, după care se aplică 1-2 picături soluţie adrenalină (1:10.000). Adrenalina este vasoconstrictoare. După observarea vasoconstricţiei se spală suprafaţa cu apă (membrana interdigitală) sau soluţie fiziologică (în cazul celorlalte ţesuturi).

Se va urmări efectul histaminei (1-2 picături 0,001M), un vasodilatator puternic. De notat efectul asupra diametrului vasului cît şi a vitezei de curgere.

Se va urmări efectul cîtorva picături de acetilcolină 0,01M. Efectul nu este foarte evident dar uneori se observă o vasodilataţie.

B. Excitarea electrică. Se observă circulaţia în membrana interdigitală. Se disecă nervul sciatic (fără a provoca hemoragie). Se leagă nervul cu un fir de aţă. Observînd o arteriolă, tăiem n. sciatic proximal faţă de legătură. Se va observa vasodilatarea paralitică. Se excită capătul periferic al nervului sciatic cu un curent tetanizant slab (se evită mişcarea labei prin obosirea muşchiului sau prin fixarea puternică de masă). După cîteva secunde se va observa vasoconstricţia arteriolelor (cu un micrometru ocular). La nivelul capilarelor, ca urmare a constricţiei lor, se observă o mărire a vitezei de deplasare a sîngelui iar eritrocitele capătă o formă mai alungită. După 20-40 secunde dela întreruperea excitării, vasele revin la diametru iniţial.

C. Inflamaţia. Acest fenomen poate fi studiat mai uşor la nivelul mezenterului de broască, dar poate fi observat şi pe alte preparate. După întinderea mezenterului deasupra orificiului din plută, se aplică un iritant (cristal de azotat de Ag pentru 1-2 minute) după care îl înlăturăm; inflamaţia poate fi indusă şi prin simpla manipulare a mezenterului. Se vor observa modificările în diametrul vaselor. Iniţial viteza sîngelui este mărită dar după 15-20 minute diminuează; capilarele sînt pline cu hematii, datorită exudării plasmei. Leucocitele formează un strat între peretele vasului şi hematii. Se va urmări fenomenul de diapedeză. Trebuie urmărit atent şi timp îndelungat (aproximativ 30 minute)

B.Capilaroscopie la om.

Tegumentul fin,roz dela baza unghiei degetului arătător, este curăţată bine cu o perie pentru a înlătura celulele, ce se descuamează după care se usucă;se umectează cu un ulei transparent (glicerină).Se pune degetul pe masa microscopului şi se observă tegumentul cu un obiectiv mic, folosind o lumină reflectată.Pot fi folosite razele soarelui sau orice sursă artificială de lumină.

Se va observa reţeaua de anse capilare pline cu sînge cît şi deplasarea sîngelui.Peretele vascular nu se observă.Culoarea pielii se datoreşte în deosebi sîngelui din capilare şi venule;arteriolele sînt mai profunde şi nu se văd.Culoarea devine mai albastră, odată cu cedarea oxigenului de către sînge.

Testul ocluziei pentru tonusul capilar: dilatarea capilară independentă de dilatarea arteriolelor.Se prepară o baie cu apă caldă(45°C) şi se aranjează manşeta sfigmomanometrului pe braţ. Se opreşte circulaţia în antebraţ prin mărirea brusca a presiunii din manşetă(180-200mm Hg) şi se cufundă mîna şi jumătate de antebraţ în apă caldă pentru 3 minute.Partea cufundată devine purpurie. Sub influenţa căldurii ,capilarele s-au dilatat independent şi nu datorită presiunii sanguine din arteriolele dilatate,deoarece curgerea sîngelui din arteriole a fost oprită.Acest test demonstrează activitatea independentă a capilarelor.

Testul congestiei pentru tonusul arteriolar: dilatarea capilară indusă de dilatarea arteriolelor.Se aplică pe celălalt braţ manşeta sfigmomanometrului în care formăm o presiune de 30 mm Hg. In felul acesta comprimăm venele nu şi arterele.Rezultă o congestie venoasă şi o dilatare pasivă a capilarelor,evidenţiată prin încetinirea vitezei de circulaţie a sîngelui şi închiderii lui la culoare.Cufundăm o jumătate de antebraţ în apă caldă,pentru 3 minute, după care îl scoatem şi-l examinăm înainte de a scădea presiunea din manşetă.Atît partea caldă cît şi cea rece a antebraţului, sînt intens colorate cu sînge, dar partea încălzită este roşie în timp ce partea care a stat la temperatura camerei, este albastră.Căldura a cauzat o dilatare a arteriolelor, permiţînd intrarea în capilare a sîngelui proaspăt,oxigenat.

C.Circulaţia „capilară" în aripa insectelor.

Cei care nu sînt familiarizaţi cu fiziologia insectelor,sînt adesea surprinşi de descoperirea „capilarelor" în ţesuturile lor.Deşi gazele respiratorii se deplasează prin tuburi traheale,aceste animale depind de mediul lor intern, prin care se transportă substanţele nutritive şi hormonii.

Aripile multor insecte, pot constitui un material excelent pentru demonstrarea circulaţiei în „capilare".Descriem mai jos tehnica observării, indicată de Yeager şi Hendrickson(1933).

Prepararea aripei la gîndacul de bucătărie. Se alege o bucată de lemn de balsa sau un material sintetic în care facem o depresiune de mărimea aproximativă cu insecta.Anesteziem gîndacul cu CO_2 după care îl plasăm în depresiune.Fixăm o bucată de hîrtie deasupra capului şi a pronotului(Fig.48).O bucată de hîrtie neagră se

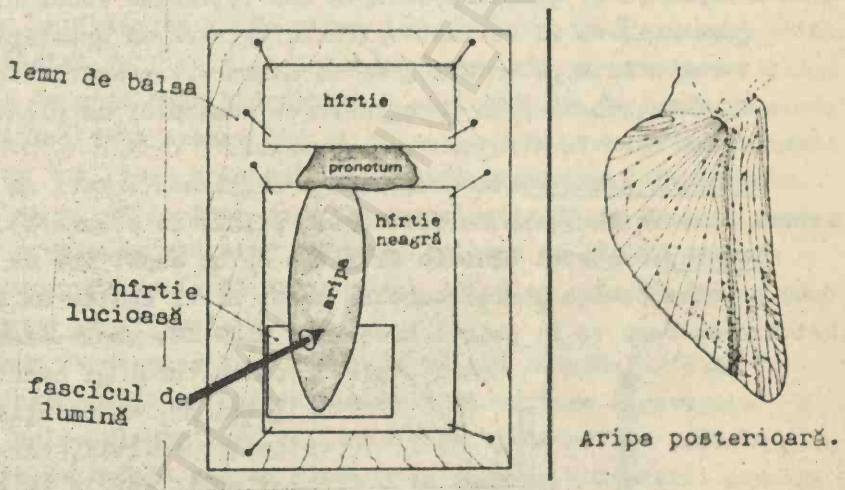


Fig.48.Prepararea aripei de insectă.

fixează deasupra abdomenului,lăsînd expusă deasupra ei o aripă. în poziţia de repaos normal.Tăiem o bucată de hîrtie lucioasă (de kimograf) şi o introducem sub aripă cu partea lucioasă în sus. Această hîrtie lăsăm.liberă pentru deplasări ulterioare.

Proiectăm pe aripă un fascicul intens de lumină şi observăm la microscop această porţiune de aripă.Mişcînd hîrtia ,vom putea urmări distribuţia „capilarelor" în aripă.Vizibilitatea depinde de reflectarea luminei de către celulele hemolimfei în circulaţie.Lumina trebuie aranjată cu atenţie,iar fasciculul trebuie să fie intens.

Uneori se observă mai uşor circulaţia în aripa posterioară,

30. ECHILIBRUL HIDRIC SI EDEMUL.

Lichidul extracelular al corpului, denumit de către C.Bernard milieu interieur, se subdivide în lichidul interstiţial, ce scaldă celulele şi lichidul intravascular, conţinut în vasele sanguine. Deşi aceste compartimente sînt separate fizic prin endoteliul capilar, între ele există un schimb reciproc de lichide şi substanţe conţinute.

Ernest Starling(1896) a emis ipoteza circulaţiei lichidelor prin peretele vascular, ca urmare a balanţei dintre presiunea hidrostatică şi coloidosmotică de la capetele arterial şi venos al capilarului.

In acest exerciţiu vom folosi un preparat de broască, perfuzat, cu scopul studierii factorilor ce influenţează schimbul lichidelor dintre capilare şi ţesuturi. Cedarea sau reţinerea lichidului de către ţesuturi, va fi estimată prin înregistrarea greutăţii corporale, înregistrată pe un kimograf în mişcare. Vasomotricitatea poate fi determinată prin înregistrarea numărului de picături de lichid, care n-au fost reţinute de broască.

Material necesar: Kimograf; peniţa Engelmann; tuburi de canulare; resort elastic lung; vas Mariotte(sau pîlnie de separare).

Tehnica: resortul elastic îl fixăm de un capăt iar de capătul opus prindem peniţa înscriitoare. La acest nivel agăţăm un cîrlig metalic de care va fi prinsă broasca(Fig.49). Se umple vasul de perfuzie, tubul şi canula de polietilen, cu soluţie Ringer pentru amfibii, care conţine şi proteină(2,5 g%. Albumina o preparăm din albuşul de ou prin separarea gălbenuşului).

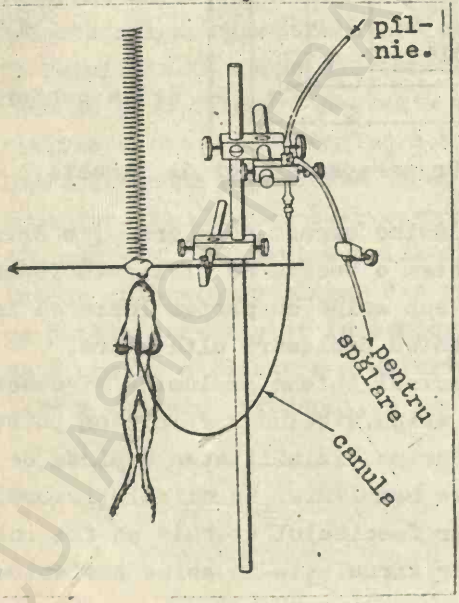


Fig.49. Schema instalaţiei.

Se vor utiliza broaşte care au stat cîteva ore la temperatura camerei. După paralizarea broaştei se exteriorizează inima şi viscerele printr-o secţiune mediană, ventrală, tăind şi centura scapulară, după care înlăturăm oasele şi muşchii din jur. Extirpăm toate viscerele cu excepţia inimii şi a ri-

nichiului.Se deschide peretele abdominal în aşa fel încît lichidul să nu poată fi acumulat în celom cînd broasca este suspendată vertical.Se introduce un fir de aţă pe sub arcul sistemic stîng în apropierea originii lui din trunchiul arterial comun, în vederea legării canulei.

Facem o mică secţiune cu un foarfece iris în trunchiul arterial.Verificăm dacă canula este plină cu soluţie Ringer şi nu conţine bule de aer, după care o introducem în trunchiul secţionat cu capătul îndreptat în direcţia opusă inimii şi legăm strîns cu firul de aţă.Facem o secţiune în sinusul venos, prin care sîngele se poate scurge uşor(sîngele venos poate fi drenat în exterior şi cu ajutorul unei canule îndoite, pe care o introducem în vena abdominală, capătul liber al canulei atîrnînd spre partea posterioară a broaştei).Deschidem clema dela tubul de perfuzie şi continuăm să perfuzăm pînă cînd spălăm tot sîngele din sistemul circulator. Debitul de perfuzie va fi de circa 1-2 picături la 5 secunde.

Cantitatea de lichid ce trece prin vase cît şi greutatea broaştei depind de presiunea hidrostatică a lichidului de perfuzie. Deoarece inima este scoasă din circulaţie, presiunea sistemică va fi egală cu înălţimea coloanei de lichid(presiunea hidrostatică). Presiunea sanguină la Rana este de aproximativ 25 mm Hg.Deci pentru a suplini presiunea sanguină normală, coloana de lichid trebuie ridicată la aproximativ 33,8cm.Cum s-a calculat această înălţime?

Procedee experimentale.

1.Punem în mişcare kimograful la viteză redusă.Perfuzăm cu soluţia Ringer-proteină cîteva minute pînă obţinem o greutate stabilă a animalului(linie orizontală pe kimograf).In primele minute pîlnia se ridică sau se coboară în vederea balansării presiunii hidrostatice.Astfel,dacă greutatea creşte, vom coborî pîlnia şi invers.Soluţia Ringer-proteină, ce se scurge din broască, poate fi refolosită pentru perioadele de echilibrare.

2.După obţinerea echilibrului(greutate constantă), perfuzăm broasca cu soluţia Ringer fără proteină.Se observă o creştere a greutăţii.Se va explica fenomenul.

3.Perfuzăm cu Ringer-proteină pînă la stabilizarea greutăţii.

4.Perfuzăm cu Ringer-proteină-glucoză(5%).Soluţia hipertonică va cauza iniţial o scădere a greutăţii.

5.Perfuzăm cu Ringer-proteină pînă la greutate constantă.

6.Se vor număra picăturile de lichid, ce se scurg din broască,

în vederea evaluării vitezei de perfuzie.Adăugăm lichidului de perfuzie, două picături de adrenalină 1/10.000 şi înregistrăm efectul asupra ratei de perfuzie,numărînd picăturile scurse.Adrenalina este vasoconstrictoare a arteriolelor şi în bună parte şi a capilarelor,ceea ce va determina scăderea numărului de picături. Cît timp durează acest efect?Cum se modifică greutatea corpului?

7.Perfuzăm cu soluţia Ringer-proteină.După ce greutatea corpului devine constantă, se va determina influenţa presiunii lichidului de perfuzie, rîdicînd sau coborînd pîlnia.Înălţimea coloanei de lichid o măsurăm cu o riglă.

Recomandări.Se vor ataşa porţiuni de grafice înregistrate. De explicat modificările observate.

Intrebări: Care este relaţia dintre presiunea coloidosmotică şi presiunea sanguină?Putem modifica metoda în vederea determinării volumului de lichid transferat pe unitate de greutate, în cazul procedeelor experimentale de mai sus?Cum?Pentru detalii teoretice, vz. Santa,Jitariu pp 435, I.Baciu,pp 269.

BCU IASI/CENTRAL UNIVERSITY

ANESTEZIEREA ANIMALELOR.

Peşti.

Se introduce peştele într-o soluţie de tricain metansulfonat (M.S.222-Sandoz) 1:10.000,pînă se obţine o anestezie suficientă, după care îl transferăm în apă dulce în vederea intervenţiei.

Batracieni.

Pentru anestezie de scurtă durată,punem broasca sub un clopot de sticlă unde am plasat un tampon de vată imbibat în eter;cînd reactivitatea animalului este suficient de scăzută,putem începe intervenţia chirurgicală.Anesteziere de durată se obţine înjectînd în sacul limfatic dorsal soluţie de uretan 10%(0,03ml/g.g.c.)

Insecte.

Introducem o cantitate de CO_2 într-un cilindru,în care plasăm insecta.

Şobolan.

Pentru perioadă scurtă, poate fi anesteziat cu eter sau eter şi cloroform(2:1,v/v) pus într-un spaţiu închis, din care respiră animalul.Pe timpul intervenţiei se poate continua anestezierea cu eter,punînd un tampon de vată imbibat cu eter pe nasul animalului. Anestezierea de durată se poate obţine cu diferite substanţe injectate în animal(vezi tabelul de mai jos).

Tabelul cu doze de anestezic pentru animale de laborator.

Animalul	Anestezicul	Calea de administrare	Doza (mg/Kg.g.c.)
Iepure	Amytal	i.v.(vena urechi)	45
	Nembutal	i.v.	25-30
	Nembutal	i.p.	30-40
	Uretan	i.p.	1550
	Clorobutanol	tub stomacal (în alcool 50%)	150-200
Şobolan	Nembutal	i.p.	45
	Sodium barbital	i.p.	200-250
	Amytal	i.p.	60
	Uretan	s.c.	1750
Cîine	Amytal	i.v.(vena safenă)	45-60
	Amytal	i.p.	60-70
	Nembutal	i.v.	25-30
	Nembutal	i.p.	45-55
	Sodium barbital	i.v.	200-250
	Phenobarbital	i.p.	180
Cobai	Sodium barbital	i.p.	100
	Uretan	i.p.	1000
Găina	Nembutal	i.v.	25-100
	Phenobarbital	i.v.	100
	Dial	i.v.	60
Porumbel	Phenobarbital	i.m.	12

i.v.=intravenos;i.p.=intraperitoneal;s.c.=subcutanat;

Compoziţia unor soluţii fiziologice(g./litru soluţie).

Soluţia		$NaCl$	KCl	$CaCl_2$	$MgCl_2$	$MgSO_4$	$NaHCO_3$	Na_2HPO_4	NaH_2PO_4	KH_2PO_4	Obs.
Mamifere păsări reptile	Sol.Fiz.	9,00									
	Locke	9,oo	0,42	0,24			0,2				lg.glucoză.
	Ringer	9,0	0,42	0,24			0,15				
	Tyrode	8,0	0,2	0,20	0,05		1,0		0,04		lg.glucoză
	Krebs-Ringer-bicarbonat:	6,92	0,35	0,28		0,29	2,10			0,16	lg.glucoză
Amfibieni.	Sol.Fiziol.	6,5									
	Ringer	6,5	0,14	0,12			0,2				lg.glucoză
	Harris	5,26	0,22	0,22		0,12	2,52	0,33	0,07		0,54 g.""
Teleostieni apă dulce	Hickman	6,42	0,15	0,22		0,12	0,084		0,06		
	Holmes& Stott	7,40	0,36	0,17			0,31	1,60	0,4		In deosebi pentru salmonide.
Teleosteni marini.	Forster & Hong	7,80	0,18	0,166	0,095		0,084		0,06		
Rac	Prosser	18,00	0,8	1,50			0,20				
Crustacei marini	Cole	26,70	1,11		0,36	0,62					Se adaugă 3,4gCaSO$_4$;17,6 ml 0,5M acid boric + 0,958 ml NaOH 0,5M la litru soluţie.
Insecte	Sol.Fiziologică:	7,5									
	Yeager	10,93	1,57	0,83	0,17						
Moluşte apă dulce	Potts	0,819	0,037	0,555					0,035		0,18g glucoză+ NaOH la pH 7,5
Rîmă	Prosser & Zimmerman	6,0	0,12	0,20			0,10				

Sol.Fiz.=soluţie fiziologică. Glucoza se adaugă în momentul folosirii.

BCU CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

Anticoagulanţi.

1.Citrat trisodic 3,8%. Se utilizează o parte soluţie la 9 părţi sînge.Anticoagulantul poate fi deasemeni uscat pe pereţii vasului de colectare a sîngelui,păstrînd aceeaşi proporţie: 3,8 g citrat la litru sînge.

2.Oxalat de sodiu 2,8 %. 1 volum soluţie pentru 9 volume sînge.Soluţia poate fi mai concentrată;pentru 1 litru sînge se va utiliza o cantitate de 2,8 g. oxalat de Na.Colectînd sînge de la abator pentru obţinerea plasmei oxalatate,trebuie avută grija de a amesteca uniform sîngele cu anticoagulantul.

3.Anticoagulantul Wintrobe:

-oxalat de amoniu....1,2g.
-oxalat de potasiu...0,8g.
-apă distilată.....100ml.

1 ml din amestec, uscat la 37°C,serveşte la recoltarea a 10 ml sînge.Se amestecă prin răsturnarea uşoară, fără a face spumă.

4.Soluţie heparină.

Heparina din comerţ, conţine 5000 U/ml.Poate fi diluată cu soluţie fiziologică,în vederea injectării în animal.Pentru şobolan de 200 g, se injectează 1 ml soluţie diluată, conţinînd 1000 U. Injectarea se face în vena femurală.

Soluţie Vernis pentru fixat grafice.

1).60g. colofoniu(sacîz) praf, se solvă la rece în 1500 ml acetonă.

2). 125g. gumă Sandarac praf, se adaugă treptat în 1000 ml alcool 96% în timp ce acesta fierbe pe baie electrică.Dacă rămîne substanţă nedizolvată, se filtrează prin vată de sticlă.

3). 60 g. mastic în mărgele se adaugă la 1000 ml alcool 96% în timp ce alcoolul fierbe pe baie electrică.

BCU IASI CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

TEHNICI SPECIALE.

A.Tehnica colectării sîngelui şi a injectării.

La majoritatea vertebratelor, sîngele poate fi colectat prin puncţia cardiacă directă.

Iepure.

Colectarea sîngelui şi injectarea substanţelor, se face prin vena marginală a urechii.Iepurele este imobilizat cu ajutorul mîinilor(Fig.50), sau într-o cuşcă.Se dilată vasele prin încălzirea urechii cu o lampă incandescentă de cîţiva waţi, după care comprimăm vasele la baza urechii cu o agrafă.Se introduce un ac de seringă (Nr.20), ataşat la o seringă heparinizată,după care se aspiră lent.După obţinerea unei cantităţi suficiente de sînge, extragem acul,acoperim puncţia cu un tampon de vată şi comprimăm locul înţepat..cîteva minute pînă se opreşte hemoragia.

Fig.50.Injecţia intravenoasă la iepure.

Uneori se foloseşte xilolul pentru dilatarea vaselor, dar acesta întăreşte ţesuturile, ceea ce îngreunează colectarea ulterioară a sîngelui.

Inainte de injectare în vena marginală, se va scoate agrafa de la baza urechii, după puncţia venei.

Sîngele poate fi colectat şi prin secţionarea venei marginale cu o lamă tăioasă,după hiperemia prealabilă a urechii, lăsînd să curgă sînge direct într-o eprubetă ce conţine cîteva picături de heparină.

Sobolan.

Putem colecta sînge direct din inimă,din plexul venos retroorbital,vena femurală, prin canularea permanentă a aortei sau venei cave.

Tăierea cozii, deşi nu este o metodă prea elegantă, este una

din cele mai simple şi larg răspîndite.

Incălzim coada cu o lampă incandescentă sau o introducem într-un pahar cu apă caldă pentru cîteva minute.După uscarea cozii tăiem vîrful ei cu un foarfece foarte ascuţit,şi colectăm sînge într-o eprubetă ce conţine cîteva picături de heparină.Putem accelera curgerea sîngelui, făcînd cîteva masaje de-a lungul cozii. Final acoperim vîrful cozii cu un tampon de vată pe care-l prindem cu o pensă de artere sau strîngem cu degete pînă se opreşte hemoragia.

Injectările intravenoase pot fi făcute prin venele cozii sau femurală.Dilatăm vasele cozii prin încălzirea ei în pahar cu apă, masăm coada de la bază spre vîrf şi după ce venele laterale proemineză prin comprimarea vaselor la bază, introducem un ac de seringă (Nr.20) în venă, aspirăm sînge pentru a ne convinge că acul a pătruns în vas, după care injectăm lent.

Pentru injectarea intraperitoneală, ţinem animalul cu mîna stîngă, întindem abdomenul trăgînd de piele de partea opusă nouă; înfigem acul(Nr.23-25) nu prea adînc(sub 1 cm); aspirăm cu seringa pentru a ne convinge că acul n-a pătruns în vas după care injectăm.

Peşti.

Se preferă a colecta sînge din circulaţia caudală.Aceat procedeu este superior puncţiei cardiace, căci putem colecta o cantitate mai mare de sînge, cauzînd mai puţine răni animalului.

Anesteziem peştele în M.S.222.Folosim un ac de seringă nr.18-20 pentru peşti peste 600 g şi 22-23, pentru peşti mai mici.Heparinizăm seringa.Sînt eficace aproximativ 1000 unităţi heparină pentru majoritatea peştilor.Menţinînd branhiile submerse,întoarcem peştele anesteziat şi apucăm bine de înnotătoarea caudală.Pătrundem cu acul de seringă prin tegumentul părţii medio-ventrale a înnotătoarei caudale, pe care-l îndreptăm anterior pentru a pătrunde prin spinii hemali.Menţinem în seringă o uşoară presiune negativă după ce acul a pătruns în canalul hemal,încît puncţia venei va fi indicată de pătrunderea sîngelui în seringă.Sîngele poate fi colectat din aorta dorsală sau vena caudală.După

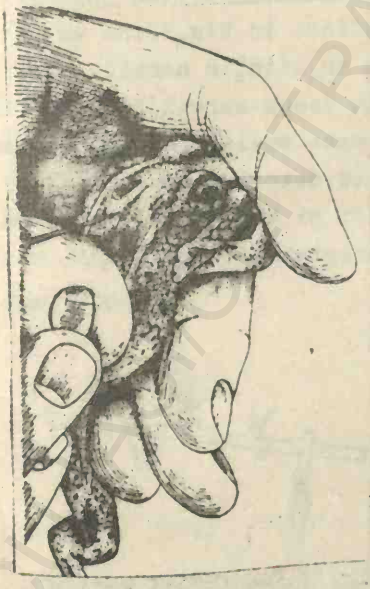


Fig.51.Paralizarea broaştei.

colectarea sîngelui, comprimăm locul înţepat timp de cîteva minute pentru oprirea hemoragiei.

Pentru injectări intraperitoneale se folosesc ace de seringă, scurte Nr.23-26.

B.Paralizarea broaştei.

Se ţine broasca în mîna stîngă;cu degetul arătător îndoim capul,ca în Fig.51.Cu un ac de paralizat, localizăm depresiunea de la extremitatea posterioară a craniului(articulaţia craniovertebrală) în care înfigem vertical acul,pînă atingem ţesutul nervos(broasca tresare;aproximativ 2 mm adîncime).Indreptăm posterior vîrful acului şi-l împingem caudal prin canalul vertebral(îndreptăm coloana vertebrală).Prin cîteva mişcări ale acului în plan frontal şi sagital, reuşim să distrugem complet măduva spinării.Membrele posterioare devin iniţial rigide, ca urmare a excitării mecanice a măduvei spinării, iar în cele din urmă devin flasci şi nereactive la excitări periferice,datorită distrugerii măduvei spinării.

Pentru distrugerea encefalului,după înfigerea acului de paralizat la nivelul articulaţiei cranio-vertebrale,pătrundem cu el prin foramen magnum în cutia craniană;rotim de cîteva ori acul şi distrugem complet encefalul.

C.Tehnica canulării.

Vasele mai mari, cum sînt artera carotidă şi vena jugulară la iepure, se canulează prin procedeul indicat în Fig.52.Se expune vasul pe o lungime de 2-3 cm.Se separă cu atenţie nervii aderenţi de vas(de exemplu n.vag sau simpatic în teaca carotidă).Procedeul de canulare al arterelor sau venelor, este acelaşi;totuşi în cazul arterelor este nevoie de atenţie sporită,datorită presiunii mai mari din vas.De regulă atît arterele cît şi venele se canulează în direcţia inimii: arterele-pentru înregistrarea presiunii sanguine iar venele-pentru injectări.

După ce curăţăm vasul pe o distanţă de cel puţin 2 cm,introducem sub vas un fir lung de aţă.Legăm strîns capătul cefalic al vasului; capetele aţei, le lăsăm lungi. Pensăm vasul cu o pensă arterială cît mai aproape posibil de inimă.

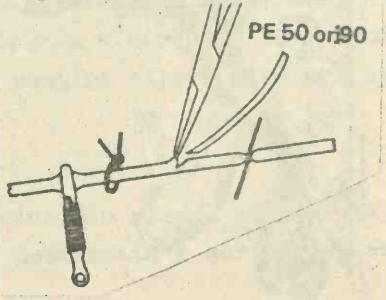


Fig.52.Canularea vaselor.

Introducem sub vas un al doilea fir de aţă, între prima ligatură şi pensă, pe care îl înnodăm lejer(vezi Figura 52).Cu un foarfece iris secţionăm vasul pe 1/2 din grosimea sa, la o distanţă de cîţiva mm de prima ligatură.Prindem cu o pensă marginile secţiunii, pentru expunerea lumenului şi introducem canula de Polietilen care a fost umplută în prealabil cu soluţie heparinizată.Impingem canula cît mai aproape de pensă arterială.După îndepărtarea pensei arteriale, canula poate fi împinsă mai spre inimă(capătul liber al canulei trebuie să fie închis).După aceasta strîngem vasul în jurul canulei,făcînd un nod strîns cu al 2-lea fir de aţă.

Vasele mai mici sînt canulate în acelaşi mod,cu excepţia că în locul pensei arteriale, comprimăm vasul prin ridicarea unui fir de aţă introdus sub vas.

Uneori introducem în vas un ac de seringă, prin care trecem un tub fin de polietilen.Procedeul este utilizat la canularea vaselor caudale la peşti.

BCU IAŞI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

612 - 019 (076.5) = 59

BIBLIOGRAFIE.

Alteraş,I.,Cajal,N.,Cojocaru,I.,şi colab.:Metodele laboratorului clinic.Ed.med.Bucureşti 1964

Artenie,V.:Lucrări practice de chimie biologică.Univ."Al.I.Cuza" Iaşi,1970

Baciu,I.:Fiziologie.Ed.did.pedag.Bucureşti,1970.

Batuev,A.,Nikitina,I.:Malîi praktikum po fiziologhii celoveka i jivotnîh.Vîsşaia şcola Moskva 1967

Benetato,Gr.:Elemente de fiziologie normală şi patologică.Ed.med. Bucureşti,1962

Best,C.H.,Taylor,N.B.:Bazele fiziologice ale practicii medicale. Ed.med.Bucureşti 1958.

Bilibin,D.P.,Vetcinkina,K.T.,Vlasova,I.G. şi col.:Praktikum po fiziologhii(K.M.Kullanda Ed.).Izd.Mediţina,Moskva,1970

Cărare,N.,Rotaru,C.:Lucrări practice de fiziologie.IMF Iaşi,1965.

Cotăescu,I.:Sîngele omului.Ed.enciclopedia Rom. 1969.

Cotruţ,M.:Lucrări practice la cursul de fiziologia animalelor domestice.Ed.did.ped. Bucureşti,1965.

Fulton,J.F.,Wilson,L.G.:Selected readings in the history of physiology.2nd.ed.C.C.Thomas.Springfield.Illinois,1966

Devenyi,T.,Gergely,J.:Amino acids,peptides and proteins.Akad.Kiado Budapest,1974.

Groza,P.:Fiziologie umană.Ed.med. Bucureşti 1971.

Harris,D.T.,Gilding,H.P.,Smart,W.A.:Experimental physiology for medical students.J.et A.Churchill Ltd. London,1956.

Hoar,W.,Hickman,C.:General and comparative physiology.Prentice-Hall,Inc.Englewood Cliffs.New Jersey,1967.

Idu,M.S.,Cîmpeanu,S.:Electroforeza.Ed.med.Bucureşti,1960

Manta,I.,Ciplea,A.:Metodele laboratorului clinic.1944.

Nicolau,C.,Nicoară,S.T.:Progrese în tehnicile hematologice uzuale. Ed.med.Bucureşti,1966.

Pora,E.,Roşca,D.,Farcaşan,V.:Tehnica pentru lucrări de fiziologie animală.Braşov,Lit.înv.1955.

Şanta,N.,Jitariu,P.:Fiziologia animalelor şi a omului.Ed.did.ped. Bucureşti,1970.

Tănăsescu,G.,Ivanovici,G.,:Ghid de tehnici curente în laboratorul clinic.Ed.med.Bucureşti,1968

Zilov,G.N.,Magniţkii,A.N.,Makaricev,A.I.et.al.:Lucrări practice de fiziologie.Ed.stat pentru literatură şt.1954

Biblioteca Centrală Universitară
BIBLIOTECA DE BIOLOGIE
Cota veche: Cump. abuv.
Preţul: 4 lei

BCU IAS/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY

BCU IAȘI/CENTRAL UNIVERSITY LIBRARY